

T H E S E S

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy

pour obtenir le grade de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Jean-François DRILLEAU

Ingénieur-Brasseur

* * * *

1ère Thèse

Etude sur l'Analyse des Extraits Commerciaux de Houblon

et sur leur utilisation

2ème Thèse

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 29 Novembre 1966 devant la Commission d'Examen

* * * *

Jury

Président : M. E. URION

Membres : M. R. GAY

M. M. METCHE (rapporteur)

T H E S E S

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy

pour obtenir le grade de

DOCTEUR-INGENIEUR

par

Jean-François DRILLEAU

Ingénieur-Brasseur

* * * *

1ère Thèse

Etude sur l'Analyse des Extraits Commerciaux de Houblon

et sur leur utilisation

2ème Thèse

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le

1966 devant la Commission d'Examen

* * * *

Jury

Président : M. E. URION

Membres : M. R. GAY

M. M. METCHE (rapporteur)

THE UNIVERSITY OF LEIDEN

LIBRARY

UNIVERSITY OF LEIDEN

LIBRARY

UNIVERSITY OF LEIDEN

LIBRARY

LIBRARY

LIBRARY

UNIVERSITY OF LEIDEN



LIBRARY

UNIVERSITY OF LEIDEN

1875

UNIVERSITY OF LEIDEN

LIBRARY

LIBRARY

LIBRARY

UNIVERSITY OF LEIDEN

LIBRARY

UNIVERSITY OF LEIDEN

Doyen : M. AUBRY

Assesseur : M. GAY

Professeurs honoraires : MM. CORNUBERT - DELSARTE - URION - ROUBAULT.

Professeurs honoraires : MM. CRUZE - RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JULY -
DELTE - EICHHORN - GODEMENT - DUBREUIL - L. SCHWARTZ - DIEUDONNE -
ALLEMANN - LONGCHAMBON - LETORT - DODE - GAUTHIER - GOUDET - OLMER -
CORNUBERT - CHAPELLE - GUERIN - WAHL.

Professeurs de conférences honoraires : MM. LIENHART - PIERRET.

Professeurs

Chimie biologique	*MALAPRADE	Chimie
Analyse supérieure	MANGENOT	Botanique
Géologie	GAYET	Physiologie
Mécanique rationnelle	BONVALET	Mécanique appliquée
Biologie animale	HADNI	Physique
Chimie théorique	*BASTICK	Chimie
Physique	*KERN	Minéralogie
Electronique	DUCHAUFOR	Pédologie
Chimie physique	GARNIER	Agronomie
Mécanique rationnelle	*WEPPE	Minéralogie appliquée
Minéralogie et cristallographie	NEEL	Chimie organique industrielle
Chimie		Géologie appliquée
Physique appliquée	BERNARD	Physique
Chimie minérale	*CHAMPIER	Chimie biologique
Radiogéologie	*GAY	Physico-chimie
Chimie	*REGNIER	Zoologie
Physique	STEPHAN	Zoologie
Géologie	*CONDE	Botanique
Génie chimique	*WERNER	Calcul différentiel et intégral
Physique expérimentale	EYMARD	Chimie organique
Chimie biologique		Méthodes mathématiques de la physique
Chimie minérale industrielle	LEVISALLES	Mécanique physique
B. Exploitation minière	Mme HERVE	Physique
	*GOSSE	
	FELDEN	

ANNEE SCOLAIRE 1965-1966

Professeur titulaire à titre personnel.

TABLE OF CONTENTS

Page
1. 1

2. 2

3. 3

4. 4

TABLE OF CONTENTS

1. 1	2. 2	3. 3	4. 4	5. 5	6. 6	7. 7	8. 8	9. 9	10. 10	11. 11	12. 12	13. 13	14. 14	15. 15	16. 16	17. 17	18. 18	19. 19	20. 20	21. 21	22. 22	23. 23	24. 24	25. 25	26. 26	27. 27	28. 28	29. 29	30. 30	31. 31	32. 32	33. 33	34. 34	35. 35	36. 36	37. 37	38. 38	39. 39	40. 40	41. 41	42. 42	43. 43	44. 44	45. 45	46. 46	47. 47	48. 48	49. 49	50. 50	51. 51	52. 52	53. 53	54. 54	55. 55	56. 56	57. 57	58. 58	59. 59	60. 60	61. 61	62. 62	63. 63	64. 64	65. 65	66. 66	67. 67	68. 68	69. 69	70. 70	71. 71	72. 72	73. 73	74. 74	75. 75	76. 76	77. 77	78. 78	79. 79	80. 80	81. 81	82. 82	83. 83	84. 84	85. 85	86. 86	87. 87	88. 88	89. 89	90. 90	91. 91	92. 92	93. 93	94. 94	95. 95	96. 96	97. 97	98. 98	99. 99	100. 100
------	------	------	------	------	------	------	------	------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	----------

TABLE OF CONTENTS

Maîtres de Conférences

TICK	Chimie M.P.C. (Epinal)
EFIN	Physique
CI	Géologie
LLAUME	Psychophysiologie
NTZ	Biologie animale
N	Physique propédeutique
ON	Physique (I.S.I.N.)
I	Chimie (I.S.I.N.)
OUZE	Géologie
IOT	Physique du solide
CHON	Physique M.P.C.
T	Mathématiques S.P.C.N.
NES	Métallurgie
ESDENT	Thermodynamique chimique appliquée
ZY	Minéralogie appliquée (E.N.S.G.)
OT	Physique M.P.C. (Epinal)
QUIN	Pédologie et chimie agricole
NARD	Physique M.G.P.
HAN	Entomologie appliquée (E.N.S.A.)
TIN	Chimie M.P.C.

.	Probabilités et statistiques
.	Mécanique (I.S.I.N.)
.	Mathématiques
.	Mécanique expérimentale
.	Génie chimique
.	Mathématiques M.P.C.
.	Mathématiques S.P.C.N.
.	Mathématiques appliquées
.	Mécanique des fluides (I.S.I.N.)
.	Physiologie animale.

Avant-Propos

Monsieur le Doyen URION a dirigé notre travail,
Monsieur METCHE nous a permis de le mener à bien,
qu'ils veuillent bien accepter ici nos plus vifs remerciements.

Nous associons à nos remerciements tous ceux qui, parmi
le Personnel de l'Ecole nous ont aidé.

1781-1782

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551914_0037

A ma Mère, à mon Père

A ma Femme,

ETUDE SUR L'ANALYSE DES EXTRAITS

COMMERCIAUX DE HOUBLON ET SUR LEUR UTILISATION

S O M M A I R E

	<u>Pages</u>
I - HISTORIQUE	1
II - LES EXTRAITS DE HOUBLON	6
III - APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE A LA SEPARATION DES RESINES DE HOUBLON	10
IV - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	14
V - CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROGRAPHIE	16
VI - APPLICATION AUX CONCENTRES SANS TANIN	17
VII - PHOTODENSITOMETRIE - TECHNIQUE	21
VIII - PHOTODENSITOMETRIE - RESULTATS	24
IX - EVOLUTION DES ACIDES ALPHA	27
X - CONCLUSION	29

I - HISTORIQUE.

La valeur d'un houblon dépend de sa teneur en résines molles et spécialement de deux fractions : les acides alpha et les acides bêta.

A) Définition des résines molles

Les résines dites "molles" à cause de leur consistance représentent conventionnellement la fraction des résines totales solubles dans l'éther de pétrole ; elles renferment plusieurs composés définis dont la structure contient un système de cycle plus ou moins substitué. Ces différentes substances sont représentées dans le tableau N° 1. Les acides alpha (A), les plus abondants, sont des stéréoisomères lévogyres de l'humulone et de ses analogues.

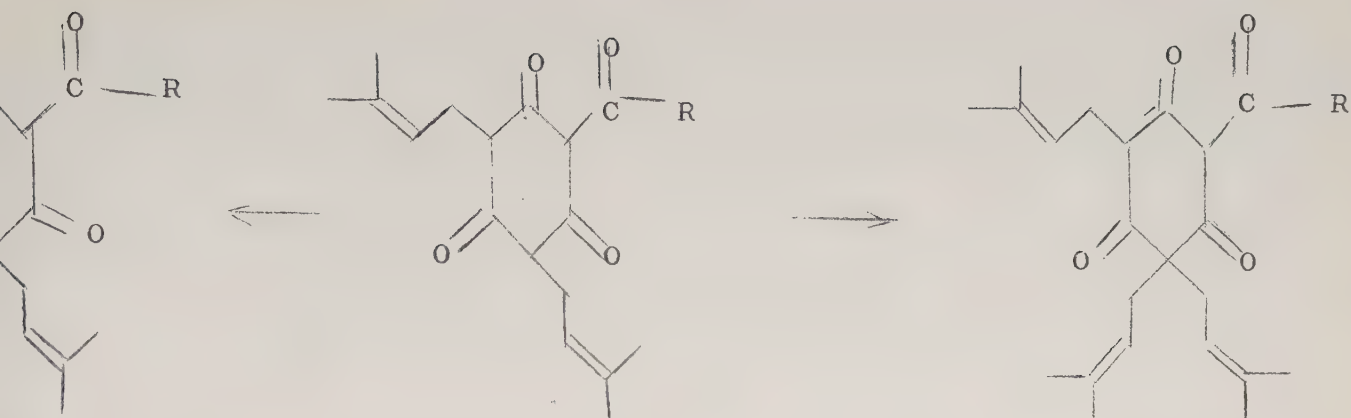
Il convient de signaler en outre :

- les désoxyhumulones (C) qui sont les précurseurs biogénétiques des substances précédentes ;
- les humulinones provenant de l'oxydation des acides alpha et qui, inexistant dans le houblon, seraient présents dans les extraits commerciaux et dans le moût ;
- les hulupones (D) produits par l'oxydation à l'air, et par l'ébullition dans le moût des acides bêta.

Chacune de ces substances contribue pour sa part à l'amertume de la bière finie :

- les acides alpha, au cours de l'ébullition du moût, s'isomérisent en acides iso-alpha (E) qui sont responsables de la majeure partie de l'amertume ;
- les acides bêta, pratiquement insolubles en milieu aqueux, s'oxydent en hulupones solubles qui se retrouvent dans le moût.

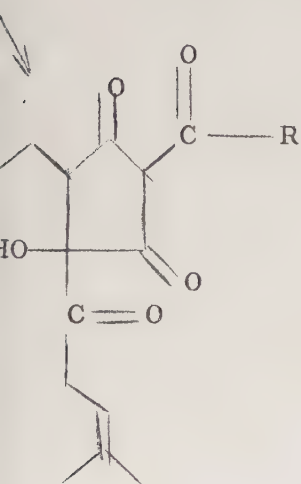
...



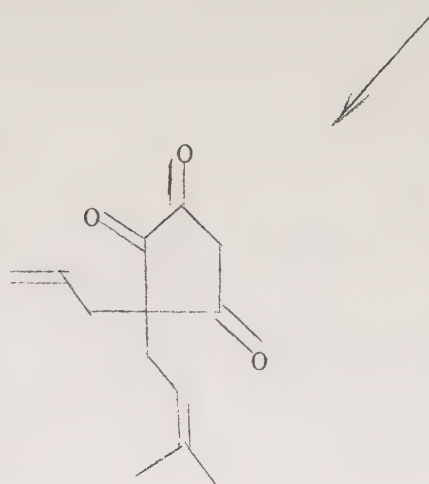
acides alpha A

désoxyhumulones C

acides bêta B



co-composés E



lupulones D

acides alpha A

humulone

humulone

humulone

acides bêta B

lupulone

colupulone

adlupulone

R : - CH₃ CH (CH₃)₂

R : - CH (CH₃)₂

R : - CH (CH₃) CH₂CH₃

TABEAU N° 1

Q

7

11

12

13

14

Selon WHITEAR (2), une bière de densité moyenne, houblonnée de façon conventionnelle, présente une amertume qui serait attribuable aux différents composés suivant les proportions :

- acides iso-alpha	60 %
- hulupones	5 %
- dérivés inconnus des acides alpha	30 %
- dérivés inconnus des acides bêta	5 %

On constate que les dérivés des acides alpha comptent dans l'amertume pour 90 %. Notre étude a donc surtout porté sur les acides alpha.

B) Dosage des acides alpha

Plusieurs méthodes ont été proposées pour un dosage précis :

- précipitation par l'acétate de plomb, accompagnée d'une titration conductométrique ;
- mesure du pouvoir rotatoire ;
- spectrophotométrie avec détermination de la densité optique en U.V.

a) Les acides alpha sont des acides forts, qui en solution dans le méthanol, donnent des précipités avec les acétates de plomb et de cuivre.

WOLLMER (3) a initialement utilisé l'acétate de plomb et repéré l'humulate jaune formé par gravimétrie.

Le procédé d'extraction de WOLLMER est résumé dans le tableau N° 2 :

Tableau N° 2

Extraction des résines totales du houblon par l'éther diéthylique



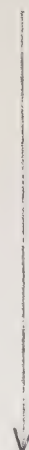
Evaporation d'une partie aliquote et reprise avec du méthanol

Evaporation d'une partie aliquote et pesée ; on obtient les résines totales

Une partie aliquote est extraite dans une ampoule à décanter par un mélange d'hexane et d'eau salée . Les résines molles passent dans l'hexane qui surnage.



Evaporation d'une partie aliquote reprise du résidu au méthanol. On procède à la titration des acides alpha par pesée de l'humulate comme WOLLMER ou par conductométrie



Evaporation d'une partie aliquote. La pesée du résidu donne les résines molles totales.

A l'heure actuelle on opère généralement par conductométrie.

Les acides amers alpha amenés en solution méthanolique, sont introduits dans la cellule de titration d'un conductomètre et on y ajoute progressivement une solution méthanolique d'acétate de plomb titrée. Pendant toute la durée de la précipitation de l'humulate de plomb, la conductivité du milieu reste constante ; dès qu'il y a excès d'acétate, cet électrolyte entraîne un accroissement régulier de la conductivité. Le graphique

donnant l'évolution de la conductivité en fonction du volume d'acétate ajouté, comporte une droite sensiblement horizontale suivie d'une courbe inclinée très proche de sa tangente initiale. Le point de cassure est assez net pour qu'on puisse lire le volume de la solution titrée d'acétate de plomb employé. La teneur du houblon en acides alpha s'en déduit par un facteur lui-même déterminé par des essais préalables. Pour tenir compte des analogues de l'humulone et de leur proportion respective dans les houblons, il semble que l'on puisse adopter un poids moléculaire moyen des acides alpha de 357,8. L'erreur maximum due à la variation de proportion d'un houblon à un autre paraît s'établir à 2 %. D'autre part, on tient compte de l'effet de dilution sur le facteur de multiplication.

SCHUR (4) pense que cette méthode associée à la conductométrie, donne de bons résultats pour des houblons à faible teneur en fraction bêta. L'E.B.C. dans ANALYTICA, préconise une extraction au benzène, tandis que TROLLE et DJURTOFF (5) utilisant le chloroforme, montrent que le taux des acides alpha ainsi obtenu est une très bonne indication de la valeur brassicole du houblon, même si celui-ci est vieux ; ceci, vérifié par les Laboratoires de CARLSBERG, a été démenti par HARTONG, JANSEN, et MENDLICK (6).

Ces nombreux modes opératoires ne donnent pas vraiment satisfaction, puisqu'ils conduisent à des résultats différant entre eux jusqu'à 20 %. De plus, lorsqu'un houblon vieillit naturellement ou lorsqu'on en retire les actuels extraits commerciaux, il se forme d'autres substances par oxydation, capables de précipiter avec de l'acétate de plomb : hulupones et humulinones : d'où des résultats erronés lorsque la teneur de ces produits augmente.

b) Polarimétrie : La méthode polarimétrique est fondée sur le principe suivant : dans les extraits de houblon, faits dans l'éther ou les hydrocarbures, les acides alpha sont les seules substances possédant une activité optique. SALAC et DYR (7), puis GOUGH (8) et VERZELE (9) ont spécialement étudié cette méthode ; celle de VERZELE (10) est la plus simple : on place dans le fond d'une colonne à chromatographie, un tampon de coton hydrophile, puis 1 à 2 grammes de charbon actif et 10 grammes de houblon moulu ; l'ensemble est alors lavé avec 75 ou 100 ml d'éther diéthylique ; la solution obtenue est suffisamment claire pour une mesure polarimétrique.

On a reproché à cette méthode de n'être pas valable dans le cas de vieux houblons, les acides alpha subissant une racémisation dans le temps. Cependant HOWARD (11) a montré qu'en utilisant sa technique, la critique n'était pas justifiée. Nous pourrions en déduire que la polarimétrie permet de déterminer avec exactitude la teneur du houblon en acides alpha ; toutefois, il n'est pas unanimement démontré que toutes les autres résines sont dépourvues d'activité optique.

c) Spectrophotométrie : ALDERTON et col. (12) mesurent l'absorption des solutions d'acides alpha et d'acides bêta en U.V. Ces acides interfèrent, et pour les doser séparément, il a fallu établir une équation avec mesures à plusieurs longueurs d'onde et tenant également compte à des impuretés autres que les acides bêta, ou "background", dûes au houblon lui-même. Il est évident que des plantes, même d'espèce identique, n'ont pas le même "background" et il a fallu effectuer une série de mesures nécessitant une élimination plus ou moins complète des impuretés et qui ont conduit tout d'abord à une équation binaire, puis plus tard, à une équation ternaire. Le solvant d'extraction, initialement de l'éther de pétrole, a été remplacé par du benzène par KLOPPER (13).

c) Discussion : Ces méthodes malheureusement, ne donnent pas rigoureusement les mêmes résultats d'un laboratoire à l'autre.

- En ce qui concerne les méthodes elles-mêmes, nous prendrons comme référence les résultats publiés dans le "Journal of Institute of Brewing" de 1964 p. 186, dont la conclusion se résume ainsi : la conductométrie et la spectrophotométrie peuvent donner des résultats similaires, mais ne sont pas spécifiques des acides alpha. Seule la polarimétrie peut donner des valeurs exactes et reproductibles, aptes à servir de référence.

- On montre par polarimétrie, que les acides alpha disparaissent plus rapidement que ne le laissent supposer les mesures conductométriques, ce qui veut dire qu'il se forme au cours du vieillissement du houblon, des substances dérivant ou non des acides alpha présentant un pouvoir rotatoire nul ou très faible, et précipitant à l'acétate de plomb, donc dosables par conductométrie : ce serait le cas des hulupones et des humulinones.

- LES EXTRAITS DE HOUBLON.

Le problème s'est encore compliqué par suite de l'apparition sur le marché d'extraits commerciaux de houblons appelés à tort "concentrés" puisqu'en même temps qu'une concentration, leur préparation entraîne une transformation partielle. Toutefois, nous continuerons à employer ce terme malgré sa mauvaise adaptation pour faciliter la confrontation de nos résultats avec ceux des autres auteurs.

A) Fabrication

Les résines du houblon moulu sont extraites dans un

solvant organique (méthanol, acétate d'éthyle, chlorure de méthylène, etc...) qui est évaporé en totalité pour ne laisser qu'une pâte verte ou brune, plus ou moins visqueuse, dont l'aspect dépend du houblon initial et du solvant d'extraction. Les tanins sont ensuite extraits à l'eau chaude (60° C). Grâce au mélange plus ou moins intégral de ces deux extractions, on récupère jusqu'à 40 à 50 % du poids initial sous forme de "concentré", forme nouvelle de houblon mais qui, malheureusement, contient des quantités notables de substances indésirables : tanins, chlorophylles, cires, etc... On trouve sur le marché, à l'heure actuelle, des "concentrés Super" très riches en résines et des "concentrés standards" qui contiennent une quantité plus grande de tanins.

B) Amertume

La formule de WOLLMER ($\alpha + \frac{\beta}{9}$) a été employée pendant longtemps, au calcul de la quantité de houblon nécessaire à l'obtention d'une bière d'amertume demandée. Pour une quantité équivalente de résines, un concentré aurait un pouvoir amérisant plus marqué qu'un houblon. L'extraction entraîne vraisemblablement des transformations non dirigées, qui conduisent à un matériau différent du houblon originel.

C) Analyse

Il n'existe pas de solution de continuité entre résines molles et résines dures, de sorte qu'il devient difficile de doser les constituants caractéristiques d'un concentré par les méthodes habituellement appliquées aux houblons.

Les principaux éléments à doser sont encore ici les acides alpha et les acides bêta.

Les ennuis proviennent de la difficulté de dissolution totale du concentré dans un solvant satisfaisant pour l'extraction des résines molles.

Les courbes de titration conductométrique sont mal définies : la même méthode pratiquée à plusieurs reprises par un même opérateur sur le même concentré "Super", pauvre en tanins,

donnera des résultats nettement différents.

On a vu que l'analyse d'un même houblon dans divers laboratoires, pouvait donner lieu à des différences de 20 % ; ces différences sont encore accrues lors de l'analyse des "concentrés" issus de ces houblons.

La spectrophotométrie conduit à des résultats assez reproductibles mais qui ne représentent pas la teneur réelle en acides alpha et en acides bêta du concentré.

Les résultats de la polarimétrie sont excellents à condition d'éliminer sélectivement les substances qui interfèrent dans la détermination des acides alpha. Selon VERZELE (7), il existerait, dans les concentrés, un mélange complexe d'acides alpha doué d'un pouvoir rotatoire spécifique différent de celui des acides alpha connus, ce qui entraîne une erreur notable sur les résultats obtenus.

D) Résultats

Voici quelques résultats extraits des études de l'A.S.B.C. 1965 sur la détermination directe des acides alpha des concentrés, suivant le type de méthode :

Tableau N° 3

	Méthode de dosage	Echantil.N°1	Echantil.N°2	Echantil.N°3
de résultats ne rs extrêmes	Spectrophotométrie	14 40.5 % 27.7/45.9	15 37.2 % 27.1/41.1	14 44.2 % 36.3/50.7
de résultats ne rs extrêmes	Gravimétrie	10 34.5 % 22.1/44.1	10 30.3 % 17.3/40.7	10 36.8 % 17.3/48.0
de résultats ne rs extrêmes	Conductométrie	3 38.0 % 40.1/35.8	3 38.4 % 36.4/41.2	1 - 42.2

Dans le tableau N° 3, les résultats par conductométrie sont peu nombreux, nous le complétons en donnant (tableau N° 4) des analyses effectuées par conductométrie sur 2 échantillons autres que dans notre laboratoire appliquant une méthode proposée par une firme spécialisée dans l'extraction des houblons :

Tableau N° 4

	Méthode de dosage	Echantil. N° 1	Echantil. N° 2
Nombre de résultats	conductométrie	6	5
Valeur moyenne		14.26 %	28.5 %
Valeurs extrêmes		11/16.5	22.7/34.5

L'échantillon N° 1 est prélevé sur un concentré "standard" donné pour contenir 15 % d'acides alpha.

L'échantillon N° 2 est un "Super" contenant 30 % d'acides alpha.

D'autre part, ces mêmes concentrés avaient été envoyés par la même usine à d'autres laboratoires, d'où les résultats indiqués sur le tableau N° 5, toujours par conductométrie.

Tableau N° 5

N° Laboratoire	Echantillon N° 1	Echantillon N° 2
1	10.1 %	26.3 %
2	9.5 %	26.6 %
3	4.7 %	28.2 %
4	14.3 %	28.5 %
Usine	15 %	30 %
Moyenne	10.7 %	26.7 %
Valeurs extrêmes	4.7/15	22.17/30

E) Discussion

Les tableaux précédents montrent clairement les difficultés qu'il y a d'obtenir des résultats cohérents dans un même laboratoire, et à plus forte raison, dans des laboratoires différents. La difficulté s'accroît encore lorsqu'il s'agit de concentrés d'origines diverses. L'idéal serait d'isoler au préalable les substances intéressantes pour les doser avec certitude et précision. Actuellement, la méthode la plus sûre de séparation est la chromatographie qui permet de séparer les groupes de résines, et parfois même de fractionner les différents acides.

- APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE A LA SEPARATION DES RESINES DU HOUBLON.

A) Chromatographie sur colonne

SPETZIG, STENINGER et BROHULT (15) ont tout d'abord utilisé la chromatographie de partage en phase inversée sur colonne pour séparer sélectivement les acides alpha des autres composés, puis ont ensuite appliqué cette méthode à la séparation des résines totales du houblon pour leur appliquer le dosage des acides alpha, des acides bêta et des hulupones.

HARTL et KLEBER (16), employant le même principe, ont signalé la possibilité de séparer les matières amères et leurs iso-composés, aussi bien dans les houblons que dans les concentrés, le moût ou la bière. Les solvants d'élution sont principalement de l'eau, du méthanol aqueux, un mélange tampon phosphate et méthanol. Les différentes fractions éluées sont récupérées à l'aide d'un collecteur de fraction automatique, et dosées par absorption dans l'U.V. Les résultats semblent acceptables, cependant certaines variations dans le spectre de la fraction isohumulones nécessitent une mise au point plus approfondie. D'autre

part, ce type de chromatographie très délicate ne sépare en général que quelques corps à partir d'un mélange et ne peut être mis en oeuvre que dans les laboratoires spécialisés.

B) Extraction à contre-courant

Cette technique, mise au point par CRAIG permet le fractionnement de substances par partages répétés entre deux phases liquides non miscibles en équilibre, se déplaçant l'une par rapport à l'autre. Elle ne comporte pas de phase solide.

VERZELE a appliqué cette méthode au fractionnement des résines alpha et bêta, mais c'est une méthode longue et fastidieuse qui ne peut être employée que dans les laboratoires de recherche.

C) Chromatographie sur papier

RAUM (18) en 1956, essaya d'appliquer la chromatographie de partage sur papier à la séparation des différentes résines. Utilisant la même méthode de travail, nous avons tenté de reproduire les résultats déjà obtenus, avec du papier d'ARCHES 304 au lieu de SCHLEICHER et SCHULL 2043 b.

- . Le solvant était celui déjà utilisé par cet auteur :
 - phase stationnaire : (eau/méthanol) (1/1 v/v)
 - phase mobile : (méthanol/tampon phosphate citrate à pH 6) (1/1 v/v).
- . La migration a duré 7 h. 30.
- . Les spots obtenus ont été observés à la lampe U.V., et révélés au sulfate ferrique aqueux à 5 %.
- . Les résultats se trouvent consignés dans le tableau N° 6 tandis que la figure 1 reproduit le chromatogramme obtenu.

...

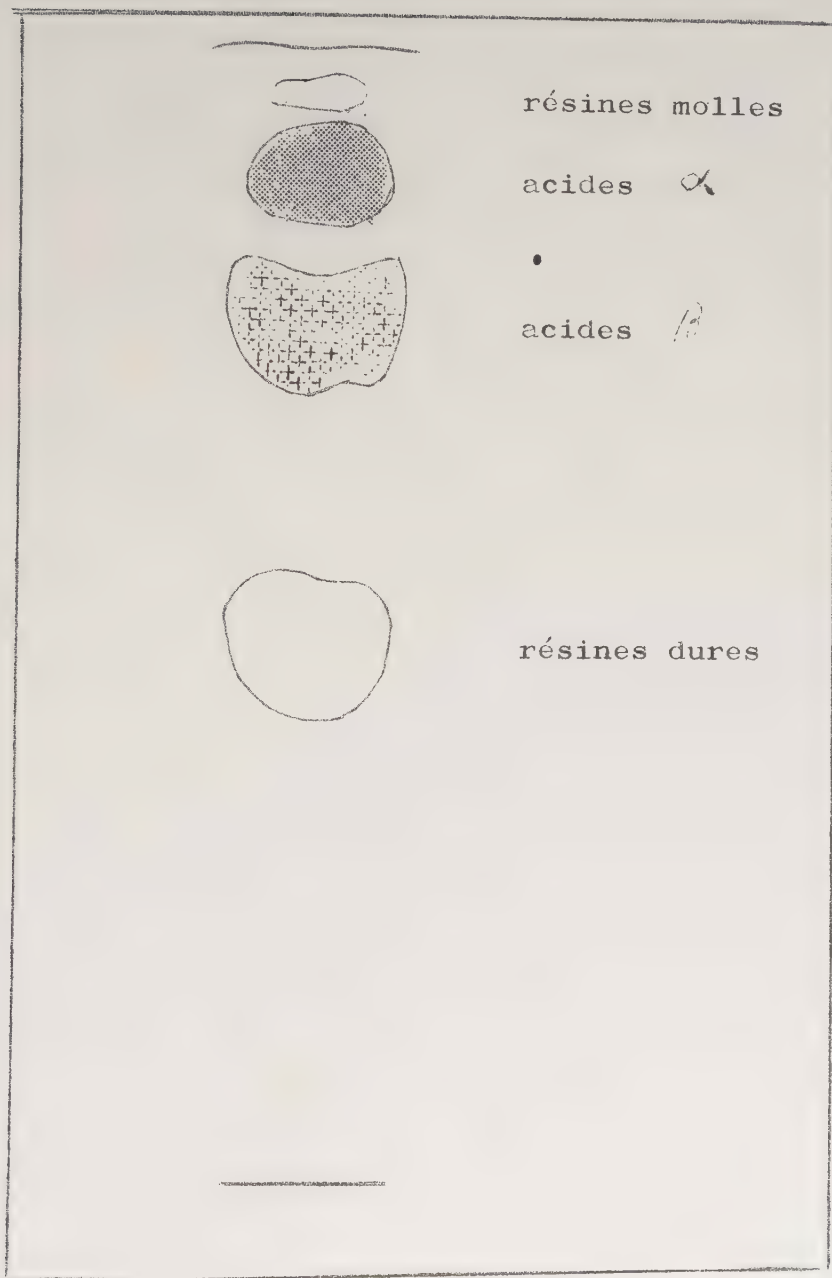


Fig. 1

Tableau N° 6

Dénomination des stances révélées	Littérature			Résultats obtenus		
	U.V.	Sulfate ferrique	Rf.	U.V.	Sulfate ferrique	Rf.
nes molles	bleu clair	marron clair	0,92	bleu clair	-	0,96
es alpha	jaune citron	gris	0,82	jaune citron	gris	0,87
es bêta	bleu	marron foncé	0,73	bleu clair	jaune orange	0,72
nes dures	marron rouge	jaune faible	0,34	sombre	jaune pâle	0,47

STOCKER (19) a mis à profit la séparation des divers constituants pour en faire le dosage quantitatif.

Pour cela, il appliqua la relation :

$\log C = k \log S$ où C est la concentration d'un constituant donné et S la surface de la tache chromatographique.

Ce dosage ne tenait pas compte de la grande complexité des résines du houblon qu'HOWARD (11) mit en évidence plus tard par chromatographie sur couche mince. Il peut alors séparer 19 fractions à partir d'un extrait méthanolique de houblon. Les quatre fractions précédentes paraissent arbitraires, chacune d'elle étant formée de plusieurs constituants ; elles ne sont pas représentatives de la complexité d'un tel mélange.

Il convient de signaler le travail de WHITEAR (20) par chromatographie sur papier en phase inversée. Selon cet auteur, il y aurait possibilité de séparer les différents constituants des acides alpha, c'est à dire, humulone, cohumulone, adhumulone, ce qui permettrait de connaître le rapport cohumulone à acides alpha, selon les variétés de houblon, valeur qui est intéressante car la cohumulone possède le taux d'isomérisation le plus élevé du groupe. Cette méthode, bien que délicate, peut être rendue quantitative par l'emploi de la densitométrie comme l'ont indiqué MORIESON et col. (21).

D) Chromatographie sur couches minces

La chromatographie sur couches minces est venue compléter les techniques précédentes. Signalée par STOCKER (19), elle a été appliquée par les japonais KUROIWA et HASHIMOTO (22), bientôt suivis par HOWARD et MARTIN (11). D'ailleurs, dans le cours de l'année, il parut un certain nombre de publications sur son utilisation, montrant ainsi son intérêt.

Les auteurs japonais ont étudié la séparation de ces substances et la possibilité de leur isolement à l'état pur : ils utilisent des couches de gel de silice ou de zéolite qui sont mises à développer dans un solvant : (n hexane, acétate d'éthyle, 4/1 v/v). Avec des substances pures, les spots après migration sont élués ensemble ou individuellement, puis mesurés par spectrophotométrie U.V. L'application de la relation de RIGBY et BETHUNE (23) permet de déterminer les quantités respectives d'acides alpha et d'acides bêta. Toutes ces opérations sont effectuées le plus rapidement possible à l'abri de l'air et de la lumière, pour éviter toute transformation et en particulier toute oxydation.

HOWARD et MARTIN (11), au cours d'un travail sur le pouvoir amérissant des vieux houblons, ont mis en évidence les possibilités remarquables de la chromatographie pour la séparation des constituants du houblon : la solution éthérée d'un houblon est évaporée à sec, et le résidu dissous dans du méthanol ; cette liqueur, après filtration sur charbon actif, est limpide et on en dépose une partie aliquote sur la chromatoplaque.

Après développement, on observe 19 taches séparées et parmi ces 19 fractions, on reconnaît les acides alpha et les acides bêta. Les spots correspondants aux acides alpha sont élués et le dosage se poursuit par spectrophotométrie, polarimétrie et conductométrie. Les valeurs obtenues par chacune de ces trois méthodes sont identiques, ce qui permet à ces auteurs de dire qu'il n'existe pas de racémisation des acides au cours du vieillissement du houblon.

E) Discussion

Les travaux précédents nous ont conduit à penser que le dosage des acides alpha ne pouvait conduire à des chiffres satisfaisants que moyennant séparation préalable. L'utilisation des couches minces nous a semblé répondre à cette nécessité, ce qui a été ultérieurement confirmé par HUDSON, WHITEAR (24) et autres.

IV - CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

A) Avant d'être mis au courant des travaux déjà cités, nous avons essayé de séparer les acides alpha et les acides bêta selon cette technique.

a) Seuls les supports à base de silice donnent de bons résultats.:

kieselgel H ou kieselgel G (MERCK)

kieselgel H ou kieselgel G (WOELM)

Silice MALLINCKRODT (Chemical WORKS USA) 100 mesh.

Les plaques sont préparées par pulvérisation selon la technique mise au point par Monsieur METCHE.(26).

b) Solvants :

1) Solvant de RETO à pH 4,8

Un litre de chloroforme est agité pendant une heure avec 200 ml d'un mélange - méthanol 100

- eau 96

- acide formique 4 v/v.

La figure N° 2 est une reproduction du chromatogramme obtenu.

2) autres solvants :

- isooctane 5

- acétate d'éthyle 1

- D.M.F. 3

- eau 3 v/v.

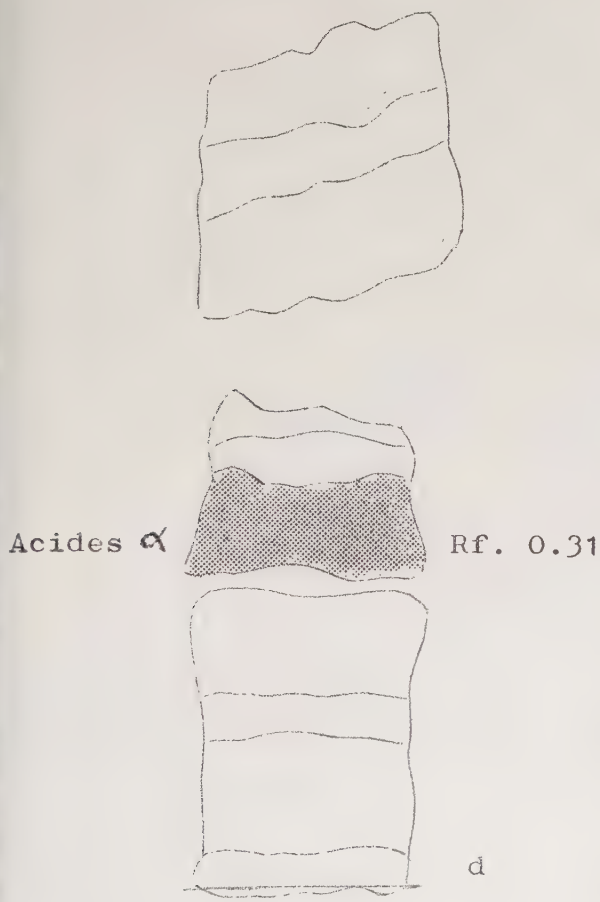
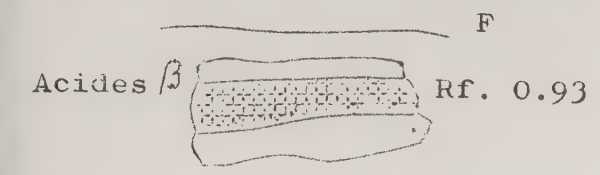


Fig. 2 (Silice G)

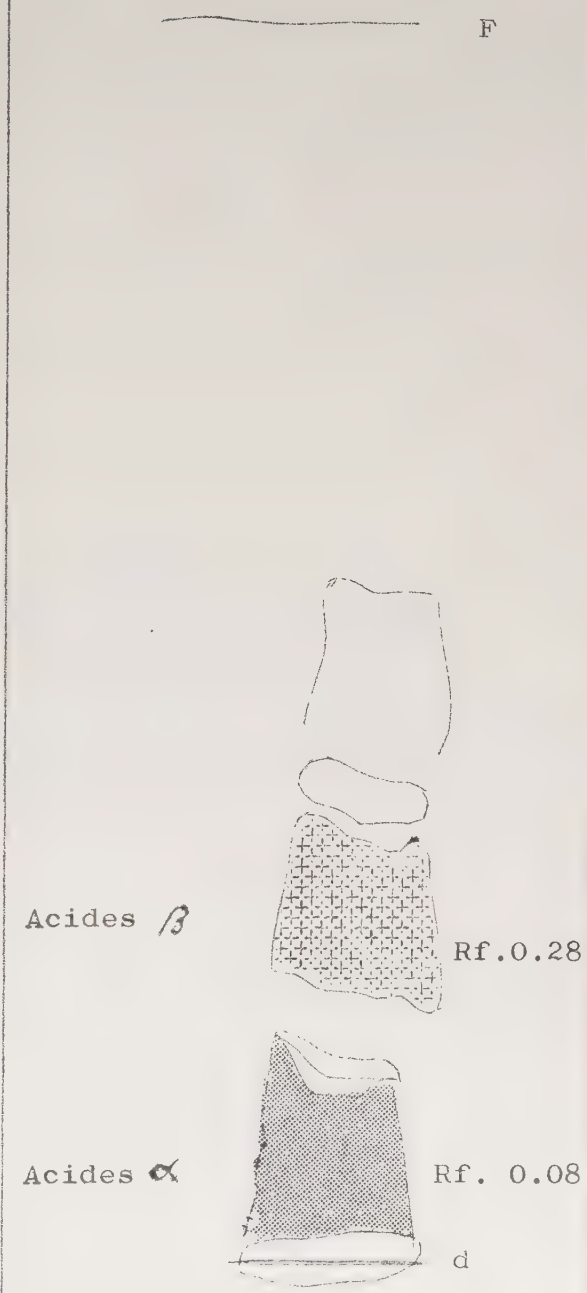


Fig. 3 (Silice G)

Ce solvant est diphasique. La phase supérieure constitue la phase mobile, la phase inférieure, la phase stationnaire (voir figure 3). La séparation a d'abord été observée en U.V. et les chromatogrammes révélés au sulfate ferrique aqueux à 5 %.

B) Nous avons adopté un solvant donnant une excellente séparation des acides alpha et des acides bêta, pour nos travaux ultérieurs.

Ce solvant est tiré des travaux de HOWARD mais a subi une modification :

hexane	20
acétate d'isopropyle	6
acide formique	1, v/v

L'acétate d'isopropyle remplace le formiate d'éthyle initialement employé, ce qui améliore l'aspect du chromatogramme.

Dans ce cas, la migration dure une heure environ ; le chromatogramme est reproduit figure 4, et on obtient les résultats du tableau N° 7.

Tableau N° 7

Dénomination des fractions	Révélateur			Rf.
	U.V.	Sulfate ferrique	Vanilline ac. phosphorique	
acides alpha	Sombre	noir	jaune	0.61
acides bêta	bleu clair	rouge orange	vert	0.79

C) La chromatographie donne une séparation suffisante des taches pour qu'on puisse en faire la base d'une méthode d'analyse. Nous avons choisi la spectrophotométrie qui se prête bien à la détermination de microquantités, mettant à profit les résultats obtenus par ALDERTON et col. (12), RIGBY et BETHUNE (23).

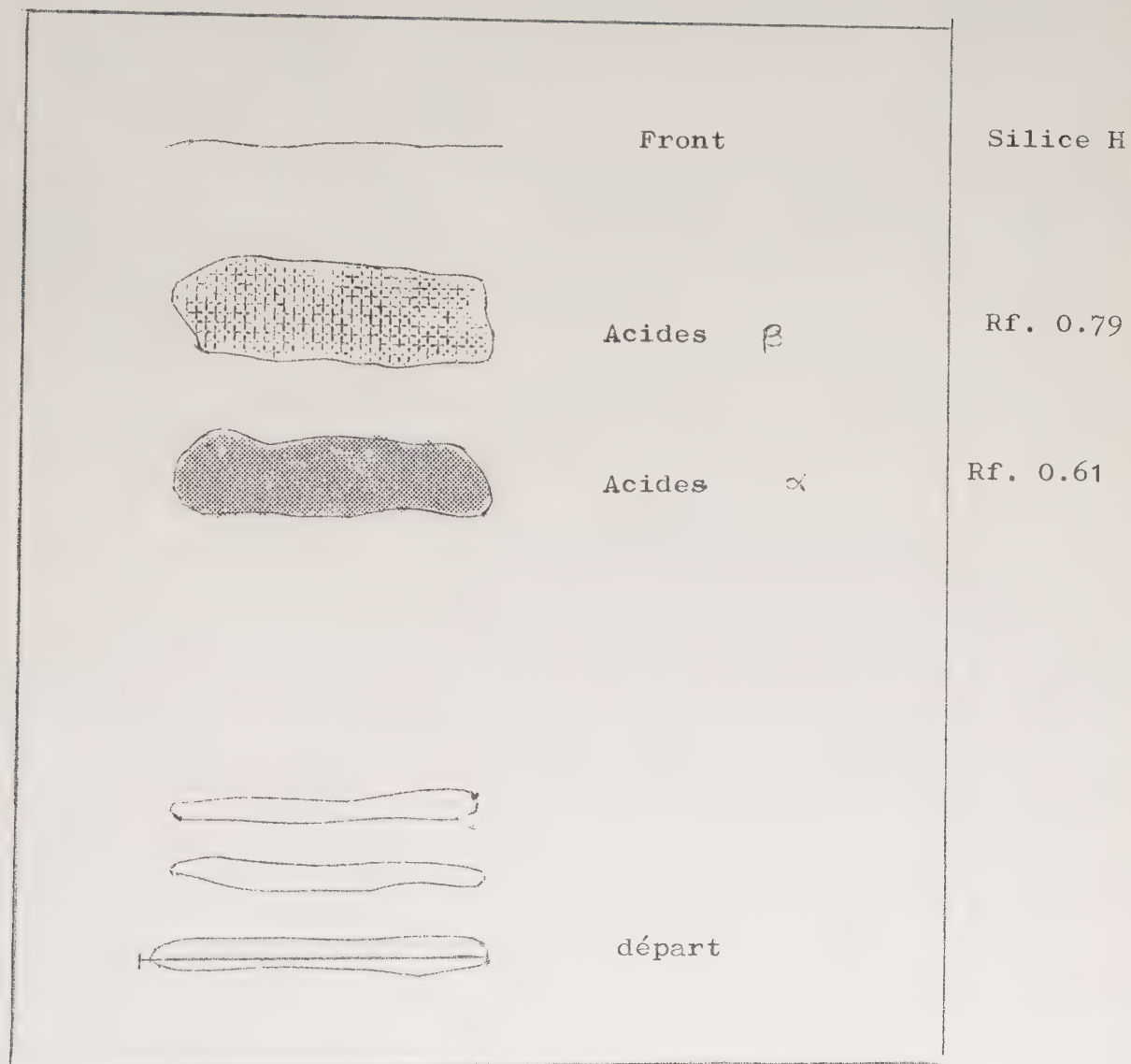


Fig. 4

V - CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROPHOTOMETRIE.

A) Les auteurs japonais KUROIWA et HASHIMOTO (22) indiquent qu'après chromatographie, le taux de récupération des acides alpha, déterminés par la mesure de la densité optique à 325 m μ varie entre 97,3 % et 99,3 %. Le taux est compris entre 97,6 % et 101,1 % lorsque l'on détermine les acides bêta à 355 m μ . Le taux de récupération est du même ordre si l'on part d'un mélange de ces deux substances.

Ils constatent ainsi systématiquement que la détermination de ces substances, après séparation chromatographique, donne des résultats plus rigoureux que la détermination directe sur un extrait global.

Dans le tableau N° 8, extrait des travaux cités, nous avons rassemblé quelques résultats comparatifs.

Tableau N° 8

s d'échantil- déposé -mg	Estimation directe	Après chromato. mg	Récupération %
ulone 0.096	0.138	0.095	98.9
ulone 0.140	0.084	0.138	98.5
ulone 0.022	0.115	0.022	100.0
ulone 0.122	0.068	0.119	97.5

B) Après séparation chromatographique à partir d'un extrait de houblon, les auteurs Anglais (11) dosent les acides alpha successivement par spectrophotométrie, conductométrie, polarimétrie. D'où le Tableau N° 9 :

Tableau N° 9 (11)

Echantillons	1	2	3	4	5
lyse avant chromatographie					
des alpha (%) - conductométrie	1,65	1,22	1,30	2,54	2,57
- polarimétrie	0,40	0,42	0,38	2,27	2,32
lyse après chromatographie					
des alpha (%) - Spectrophotométrie	0,55	0,47	0,52	2,33	2,70
- conductométrie	0,48	0,45	0,45	2,39	2,34
- polarimétrie	0,47	0,43	0,35	2,08	2,14

On constate qu'après isolement des acides alpha, les résultats des trois méthodes concordent, la spectrophotométrie donnant un chiffre légèrement plus élevé que les autres méthodes.

D'où la teneur réelle en acides alpha est déterminée avec d'autant plus de précision que la mesure a été effectuée après leurs isollements. La chromatographie sur couche mince associée à la spectrophotométrie répond parfaitement à cette nécessité.

VI - APPLICATIONS AUX CONCENTRES SANS TANINS.

Nous nous sommes d'abord intéressés aux concentrés sans tanins pour des questions de solubilité. En effet, les concentrés, où les résines sont mélangées avec les tanins extraits, sont assez difficiles à disperser intégralement dans les solvants organiques.

A) Techniques de chromatographie

- Les plaques sont préparées par pulvérisation d'une

suspension obtenue en mélangeant à l'homogénéisateur, 30 g de kieselgel H (STAHL) des établissements MERCK, et 90 ml d'une solution aqueuse d'E.D.T.A. 0,1 % (P/V) : cette quantité est nécessaire à la préparation de quatre plaques 20 X 20 cm ; après séchage à l'air les plaques sont activées 30 mn et gardées à l'exsiccateur avant usage.

L'E.D.T.A. sert à complexer le fer, impureté du gel de silice. Si cette précaution n'est pas prise, sitôt le chromatogramme exposé à l'air libre, il se produit une réaction caractéristique des acides alpha et des acides bêta avec le fer, le spot des premiers devenant jaune, et celui des secondes rouge-orange ; d'où l'impossibilité de procéder à des mesures quantitatives.

Il faut signaler que le kieselgel H (STAHL) des établissements MERCK est vendu comme contenant au maximum 0,03 % de fer. Cette valeur est une limite maximale, cette impureté devant être en quantité la plus faible possible ; ces mêmes établissements MERCK produisent des gels de silice garantis sans fer, et les établissements MALLINCKRODT U.S.A., un gel de silice dont la teneur en fer n'excède pas 0,001 %. Il est préférable d'utiliser ces derniers gels de silice.

- Le solvant de migration est : hexane/acétate d'isopropyle/acide formique (20/6/1 v/v).

- Environ 1,5 g de concentré "Super" sont placés dans un Erlen avec du méthanol et quelques billes de verre. Après dispersion par agitation énergique on filtre rapidement dans un ballon. On rince et on complète à 100 ml avec du méthanol. On dépose alors sur la plaque avec une microseringue 40 μ l de la liqueur ainsi préparée.

...

- Après développement de la plaque, les spots correspondant aux acides alpha et aux acides bêta sont délimités sous éclairage ultra violet, puis grattés et réunis ou non. L'élution a lieu par agitation avec de l'éther anhydre et centrifugation. L'opération est répétée trois fois et l'éther est évaporé à basse température. Le résidu, repris avec 6 ml de méthanol, est ainsi prêt pour la spectrophotométrie.

On prépare un témoin à partir d'une surface de gel de silice correspondant à celles occupées par les spots des substances étudiées.

L'éther doit être débarrassé des peroxydes.

B) Technique de spectrophotométrie

Nous nous servons d'un spectrophotomètre PERKIN ELMER ; le volume des cellules est de 3 ml pour une épaisseur traversée de 1 cm.

- Nous avons tout d'abord appliqué aux concentrés les équations à trois longueurs d'onde d'Alderton établies pour les houblons :

$$\text{acides alpha mg/l} = -51,56A_{355} + 73,79A_{325} - 19,07A_{275}$$

$$\text{acides bêta pg/l} = +55,57A_{355} - 47,59A_{325} + 5,10A_{275}$$

A_x représente la densité optique pour la longueur d'onde $x \text{ m}\mu$.

Une partie aliquote de la liqueur préparée pour la séparation chromatographique est placée dans la cuve du spectrophotomètre avec 1 % d'une solution aqueuse de NaOH 0,2 N.

- Après l'élution, 2,5 ml de la solution méthanolique obtenue seront placés avec 0,025 ml de NaOH 0,2 N dans la cuve de l'appareil.

La mesure de la densité optique à 325 $\text{m}\mu$ pour les

acides alpha, et à 355 m μ pour les acides bêta, permettra de doser ces deux substances si elles sont recueillies séparément.

Par contre, si l'ensemble des acides alpha et acides bêta est rassemblé, il y a lieu d'utiliser les équations de RIGBY et BETHUNE : ce sont celles que nous avons appliquées.

$$R = \frac{A_{355}}{A_{332}}$$

$$X = 2,50 R - 2,11$$

$$L + H = 27 A_{332}$$

$$L = X (L + H)$$

Ax : est la densité optique observée à la longueur d'onde x m μ .

H et L : les concentrations d'acides alpha et d'acides bêta exprimés en mg/l.

Par le jeu de la dilution, on peut ramener la quantité de substances trouvée au poids de concentré humide utilisé.

C) Résultats

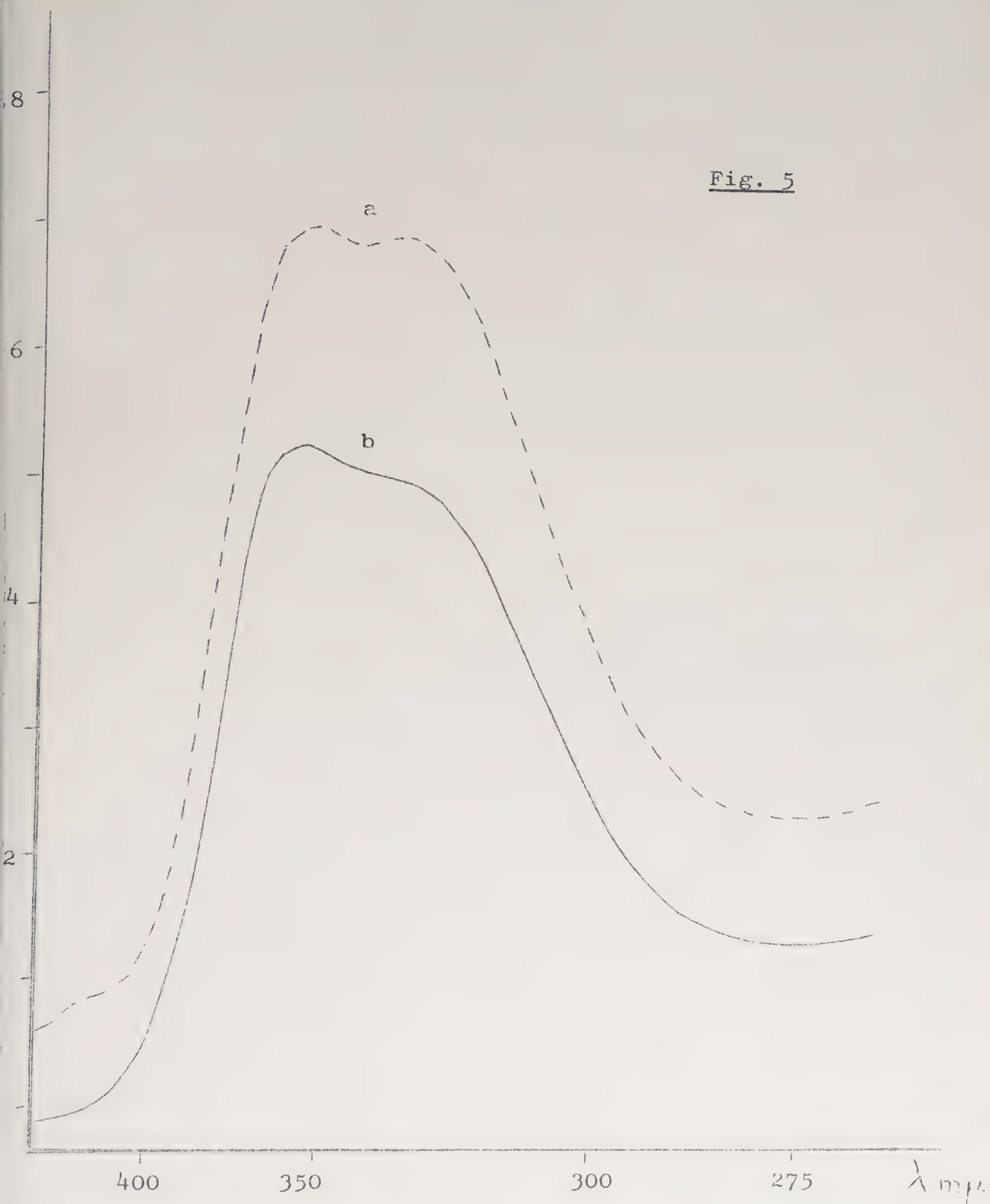
- Les figures 5 et 6 sont les reproductions des spectres obtenus au cours des différentes opérations décrites.

- Un certain nombre de valeur sont consignées sur le tableau suivant :

Tableau N° 10

	Dosage des acides α et β dans l'extrait global		Dosage des acides α et β après chromatographie	
	Acide α %	Acide β %	Acide α %	Acide β %
Concentré N° 1	47.3 45.3 48.2	20.6 20 19.2	29.8 28.4 30.1	12.3 12.2 10.9
Concentré N° 2	34.8 33.7 31.1	34 24 19	22.7 22.9 20.2	15.1 18.1 17.1
Concentré N° 3	- - - -	- - - -	28.4 27.2 26.6 26.3	23.6 21.4 23.6 22.8

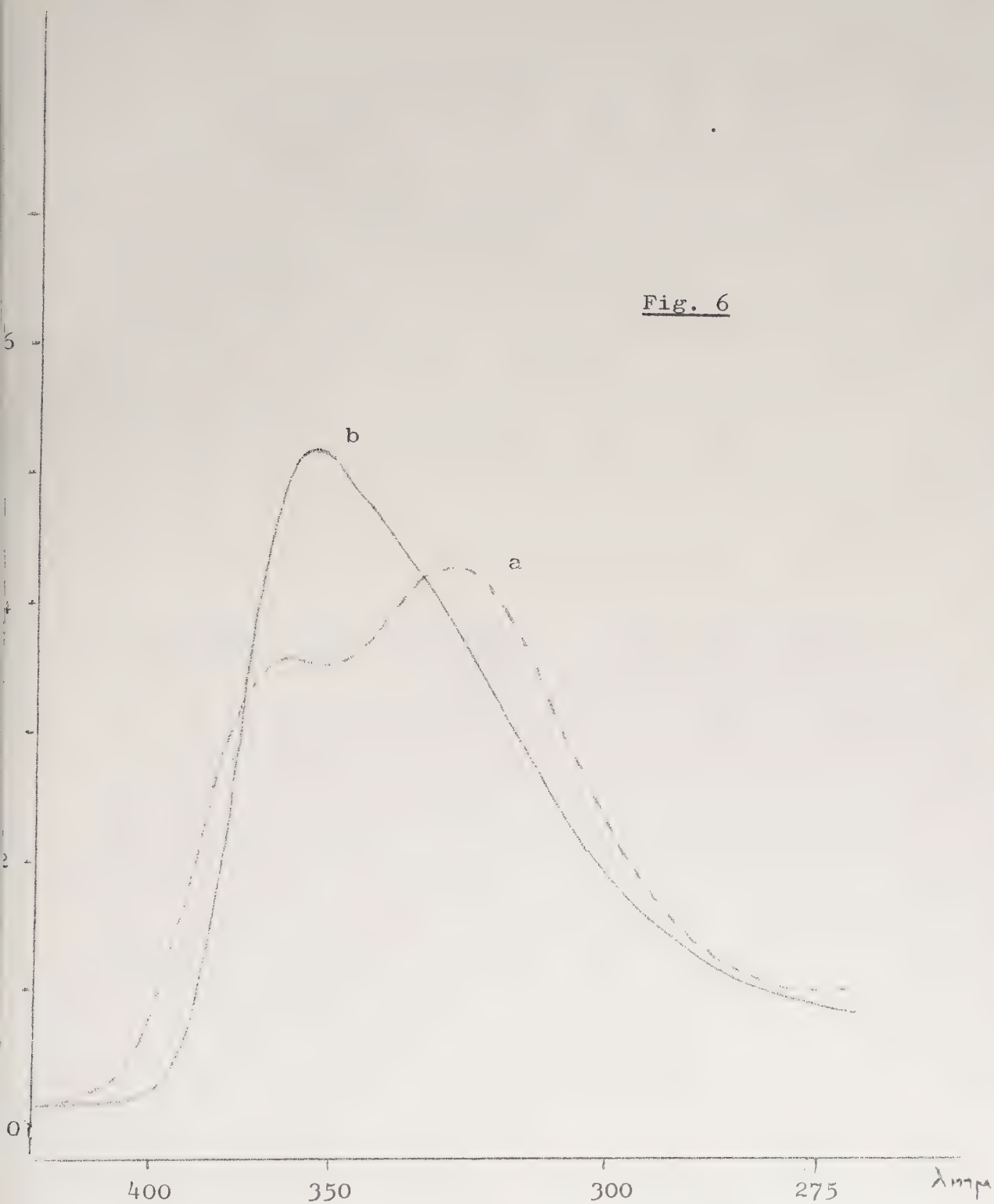
Fig. 5



a : extrait global avant chromatographie

b : mélange des acides α et des acides β après séparation

Fig. 6



a : acides α après séparation

b : acides β après séparation

En appliquant le système d'équations indiqué, les mesures obtenues par spectrophotométrie après séparation chromatographique sont fidèles, et d'après les travaux de différents auteurs (21) (22) (24)(27), la méthode décrite permet de déterminer avec précision la teneur réelle d'un concentré "Super" en acides alpha et en acides bêta.

- La méthode précédente, qui, si elle conduit à d'excellents résultats ne peut pas être utilisée dans tous les laboratoires d'entreprise, d'une part à cause du soin qu'elle demande, et d'autre part autant à cause du prix d'un spectrophotomètre de qualité. C'est pourquoi, nous avons essayé, tout en exploitant les avantages de la séparation chromatographique, d'utiliser un autre mode de dosage : nous avons choisi la photodensitométrie, compte tenu des travaux sur la détermination quantitative des acides phénols, par chromatographie sur papier, déjà effectuée dans notre laboratoire (27).

I - PHOTODENSITOMETRIE - TECHNIQUE :

A) Principe :

- Il est fondé sur l'application de la loi de BEER-LAMBERT à une substance colorée fixée sur un support solide.

On peut écrire $E = \log \frac{I_0}{I} = k \frac{a}{S}$

ou E = extinction

I_0 = intensité de la lumière incidente

I = intensité de la lumière transmise

k = coefficient d'extinction

$\frac{a}{S}$ = quantité de substance colorée fixée par unité de surface.

- On dépose sur la même ligne de départ d'une plaque chromatographique, 5 taches circulaires correspondant chacune à une dilution connue d'une solution méthanolique déterminée de concentré déjà analysé. Une fois la migration terminée, le solvant évaporé, on pulvérise un révélateur donnant une réaction colorée avec les acides alpha et les acides bêta.

Le chromatogramme (voir figure 7) présente alors deux séries de cinq spots colorés placées chacune sur une horizontale et correspondant l'une aux acides alpha ($R_f = 0,54$) et l'autre aux acides bêta ($R_f = 0,67$).

- Selon le type de photodensitomètre utilisé, il existe une relation entre la surface de la courbe d'extinction enregistrée et la quantité de substance colorée dans des limites de concentrations déterminées.

Nous avons deux types de photodensitomètre à notre disposition :

- Le photomètre ZEISS ne possède pas de photomultiplicateur ; il est relié à un enregistreur SEFRAM. Cet appareil exige le découpage au diamant d'une bande transversale du chromatogramme qui ne peut contenir qu'une seule des séries de spots. Dans ce cas, la hauteur h des courbes d'extinction des spots est fonction logarithmique de la concentration C des taches témoins enregistrées, soit :

$$h = k_1 \times \log C.$$

- D'autre part, nous avons employé un photodensitomètre enregistreur comportant un photomultiplicateur, et offrant l'avantage d'une platine sur laquelle on peut déposer la chromatoplaque sans avoir à la découper. Dans ce cas, la relation entre la surface S des courbes d'extinction et la concentration C est linéaire :

$$S = k_2 \times C.$$

B) Chromatographie :

L'enregistrement des plaques nécessite un support adhérent parfaitement à la plaque de verre et permettant une migration rigoureusement horizontale des substances étudiées. Certains gels de silice pour colonne, WOELM et MALLINCKRODT en particulier, donnent de bonnes séparations, mais qui ne se prêtent cependant pas à notre travail par suite de leurs mauvaises propriétés mécaniques. L'incorporation de liants tels que plâtre ou amidon de riz les améliorent mais perturbent alors la migration.

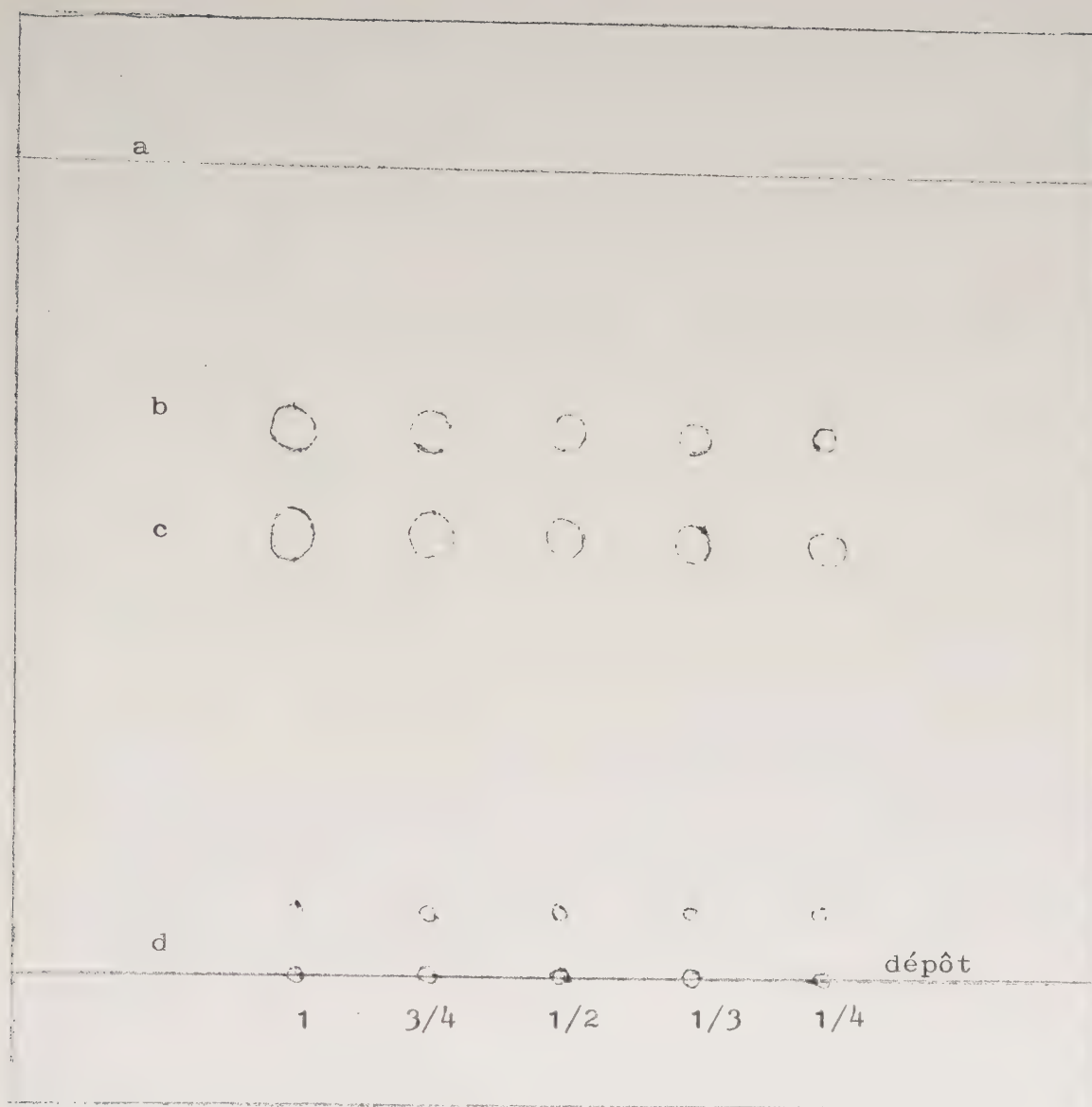


Fig.7 : Schéma d'un chromatogramme utilisé pour les mesures photodensitométriques dans les conditions indiquées dans le texte.

- a : ligne de front
- b : spots des acides bêta
- c : spots des acides alpha
- d : ligne de dépôt.

Nous utilisons donc le support préparé avec un mélange de 15 g de Kieselgel G et 15 g de Kieselgel H selon STAHL (Etablissements MERCK), homogénéisé avec 90 ml d'E.D.T.A. aqueux à 0,1 %, et pulvérisé sur quatre plaques 20 x 20 cm. Ces plaques activées 30 mn, sont conservées dans un exsiccateur.

Le solvant, (hexane, acétate d'isopropyle, acide formique) (20/6/1, v/v) est retenu.

C) Dépôts :

Environ 1,5 g d'un concentré connu, pesés exactement sont dispersés dans 100 ml de méthanol pour donner la solution mère à partir de laquelle seront préparées les dilutions ultérieures.

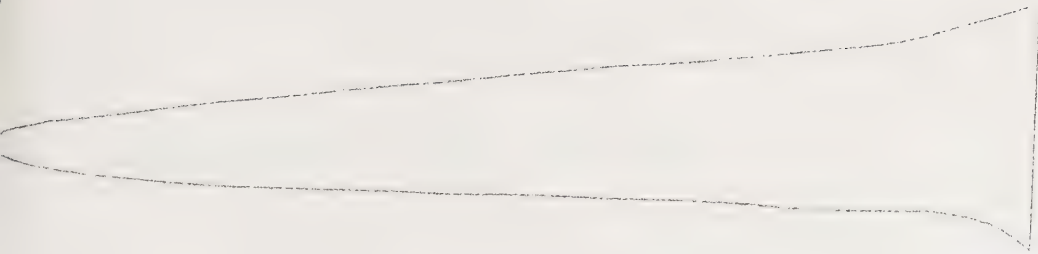
On dépose avec une microseringue, cinq spots de 10 μ l chacun μ l par μ l pour obtenir des taches circulaires, diamètre le plus petit possible. Le volume de 10 μ l représente un maximum à ne pas dépasser pour que les chromatogrammes soient utilisables. Ces volumes sont déposés sur une ligne de départ à 2,5 cm de la base de la plaque et à 2,5 cm d'intervalle.

On laisse le front migrer jusqu'à 15 cm; puis après évaporation du solvant, on pulvérise le révélateur de façon à bien imprégner la plaque.

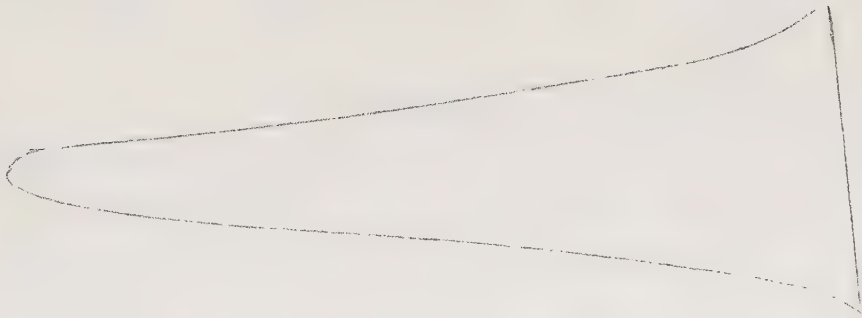
D) Révélation :

- Nous utilisons une solution aqueuse à 1 % (p/v) d'alun de fer et d'ammonium à cause de sa stabilité.

Les acides alpha se révèlent pour former de spots de couleur noir ardoise, bien nets et circulaires, comme nous le montre la figure 8 qui représente la courbe d'extinction d'un même spot enregistré dans différentes directions avec notre photo-



1



2



3

Fig. 8

mètre :

- 1) enregistrement perpendiculaire au sens de migration du solvant
- 2) enregistrement dans le sens de migration du solvant,
- 3) enregistrement selon un axe oblique : pour nous rendre compte de la régularité du spot, nous avons comparé les surfaces des trois courbes, en les pesant.

La surface correspondant à (1) pèse 115 mg, celle à (2) 116 mg et celle à (3) 123 mg. Dans ce dernier cas, l'erreur est de 5 % mais l'enregistrement correspond à une direction très défavorable (axe oblique d'une ellipse).

Les spots correspondant aux acides alpha ne posent donc pas de problème insoluble avec le photodensitomètre du laboratoire ni avec celui que nous avons emprunté.

- Malheureusement, le détecteur de notre photodensitomètre est peu sensible à la couleur rouge orangée des taches pourtant bien nettes, des acides bêta révélés. Par ailleurs, cette couleur évolue dans le temps pour devenir brun-rouille. Nous avons recherché d'autres réactions chromatiques, notamment avec le réactif de Folin-Denis et le mélange vanilline/acide phosphorique, mais sans résultat. Cependant la pulvérisation de ferricyanure de Potassium aqueux à 3 % (p/v), suivie d'un chauffage de la plaque pendant cinq minutes à 110° C, permet d'obtenir des taches bleu-foncé après refroidissement et pulvérisation d'alun de fer et d'ammonium à 1 %. Mais si la réaction est très sensible, elle n'est pas reproductible.

I - PHOTODENSITOMETRIE - RESULTATS.

A) Pour effectuer notre étude nous avons utilisé un concentré témoin dosé par spectrophotométrie après isolement, tel que :

acides alpha : 24,5 %, $\pm$ 1,5,

acides bêta : 10,8 %, $\pm$ 1.

...

1,580 g de ce concentré sont dispersés dans 100 ml de méthanol. Cette solution mère de concentration C_1 sert à préparer les dilutions $C_2 = 3/4$, $C_3 = 1/2$, $C_4 = 1/3$, et $C_5 = 1/4$, dont les concentrations sont respectivement 3,87 - 2,90 - 1,93 - 1,29 - et 0,96 mg/ml.

B) Utilisation de l'appareil ZEISS :

- La relation $h = k_1 \log C$ est valable dans la limite des concentrations C_1 à C_5 , d'où une courbe d'étalonnage donnant la concentration par simple interpolation, le volume de départ étant 10 μ l (voir figures 9a à 9b). La pente étant variable pour chaque chromatogramme, la courbe d'étalonnage ne vaut que pour un seul chromatogramme.

Nous avons vérifié la proportionnalité entre h et $\log C$ sur l'exemple particulier suivant : le mélange de 1 ml de C_1 et de 1 ml de C_3 , soit une dilution $C'_2 = 3/4 C_1$ donne sur la courbe d'extinction enregistrée, une hauteur de pic égale à celle du spot de concentration C_2 , les opérations étant faites sur la même plaque.

- Résultats : le concentré étalon à 24,5 % d'acides alpha est celui déjà cité.

Le concentré à analyser contient 15,5 % $\pm$ 1,5 mesurés préalablement par spectrophotométrie après séparation.

Tableau N° 11

de l'essai	1	2	3	4	5	6
es alpha en % at. humide	15,6	16,1	14,3	15,6	16	17,5
t maximum	14,3 - 17,5					
onne	15,8 % $\pm$ 1,6					

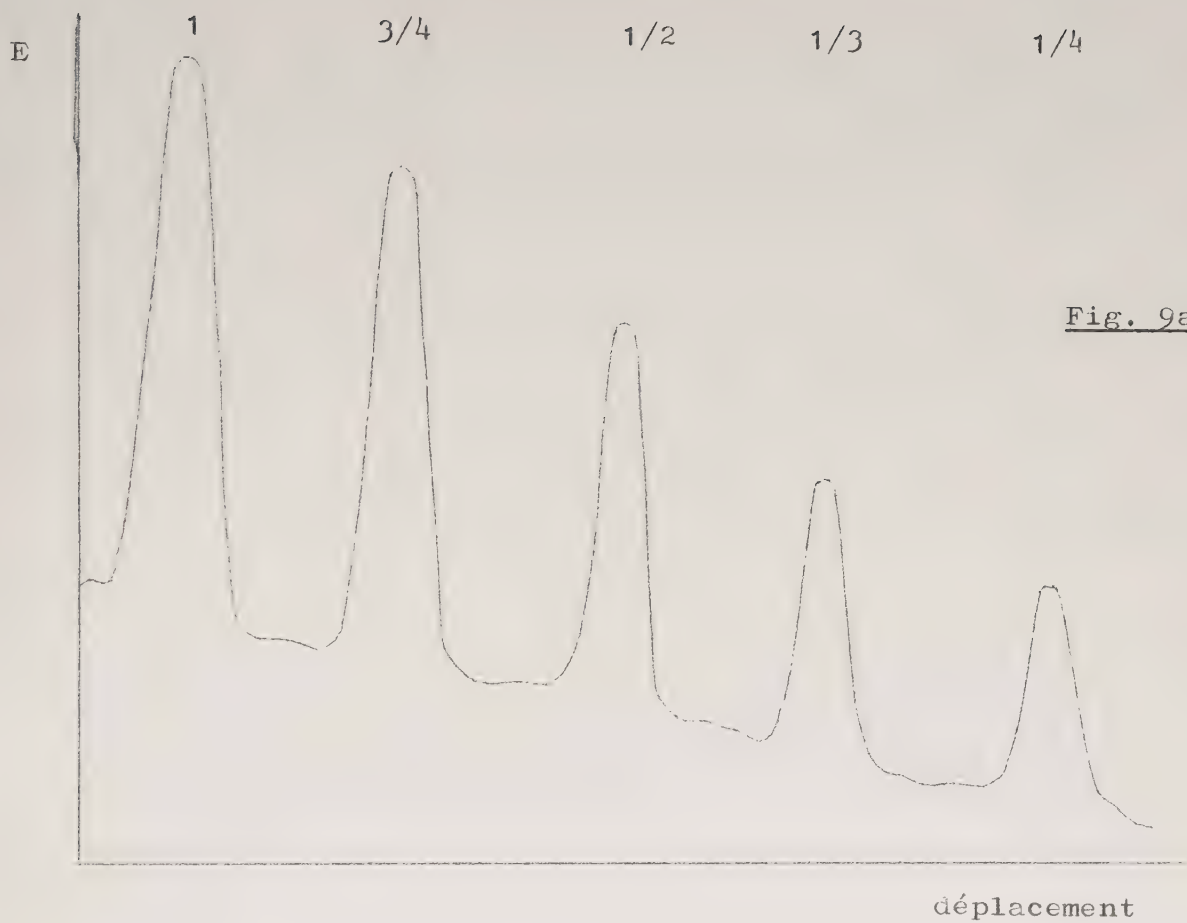


Fig. 9a

$$H = K. \log C$$

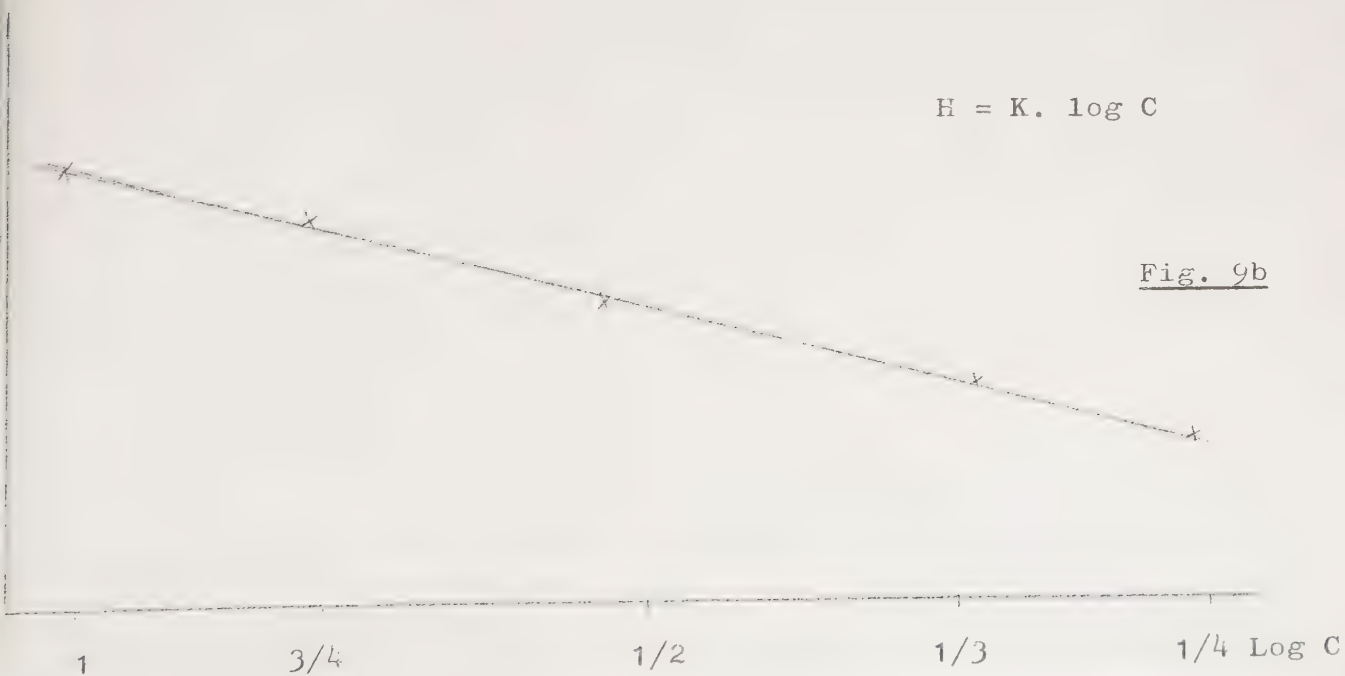


Fig. 9b

L'erreur est due essentiellement aux inégalités de coloration dues à la pulvérisation.

Pour doser rapidement la teneur en acides alpha d'un des actuels concentrés commerciaux, on effectue la mesure de la manière suivante : trois spots témoins sont déposés sur la plaque et à côté , deux spots de l'échantillon à doser, l'un représentant une dilution 1 et l'autre une dilution 1/2 ; dans ces conditions si l'une des dilutions de l'échantillon est en dehors des limites de l'échelle de concentration, l'autre sera à l'intérieur. La méthode permet le dosage avec une seule plaque chromatographique.

C) Utilisation d'un photodensitomètre muni d'un photomultiplicateur :

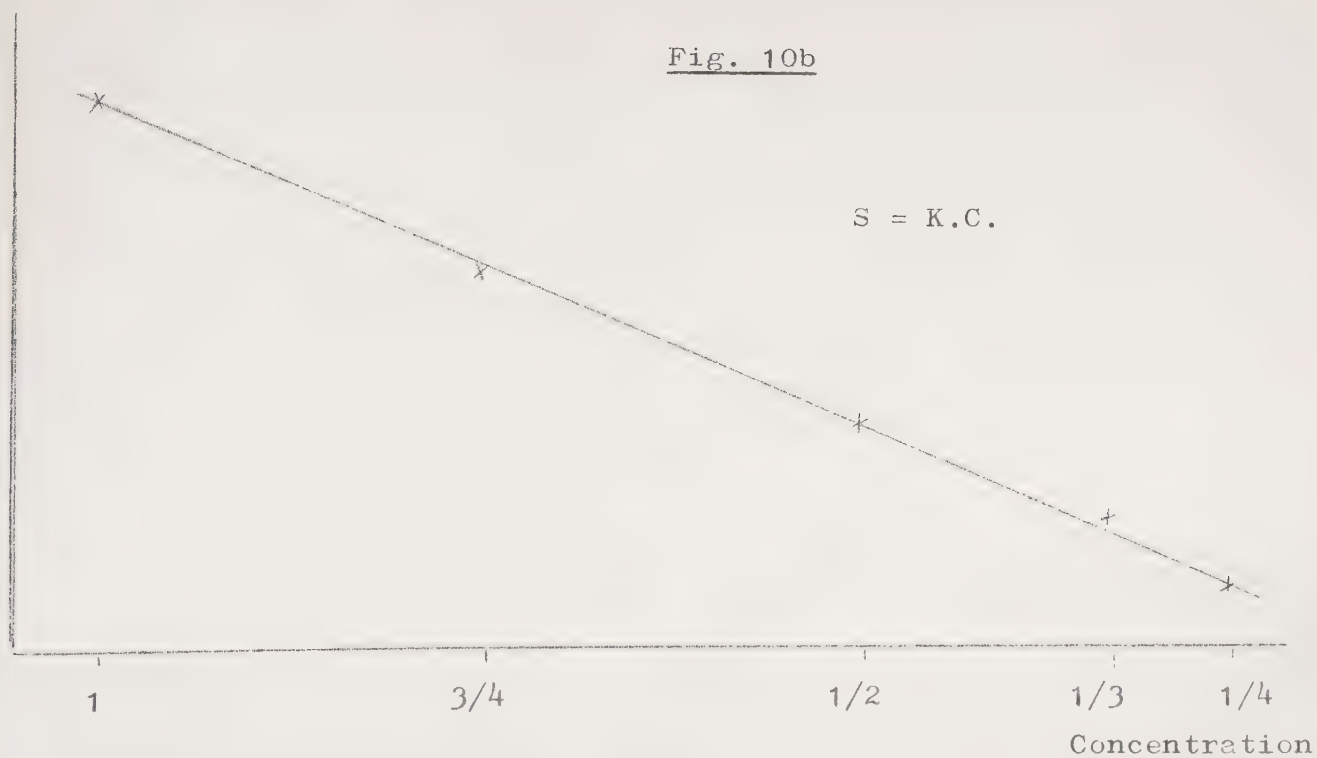
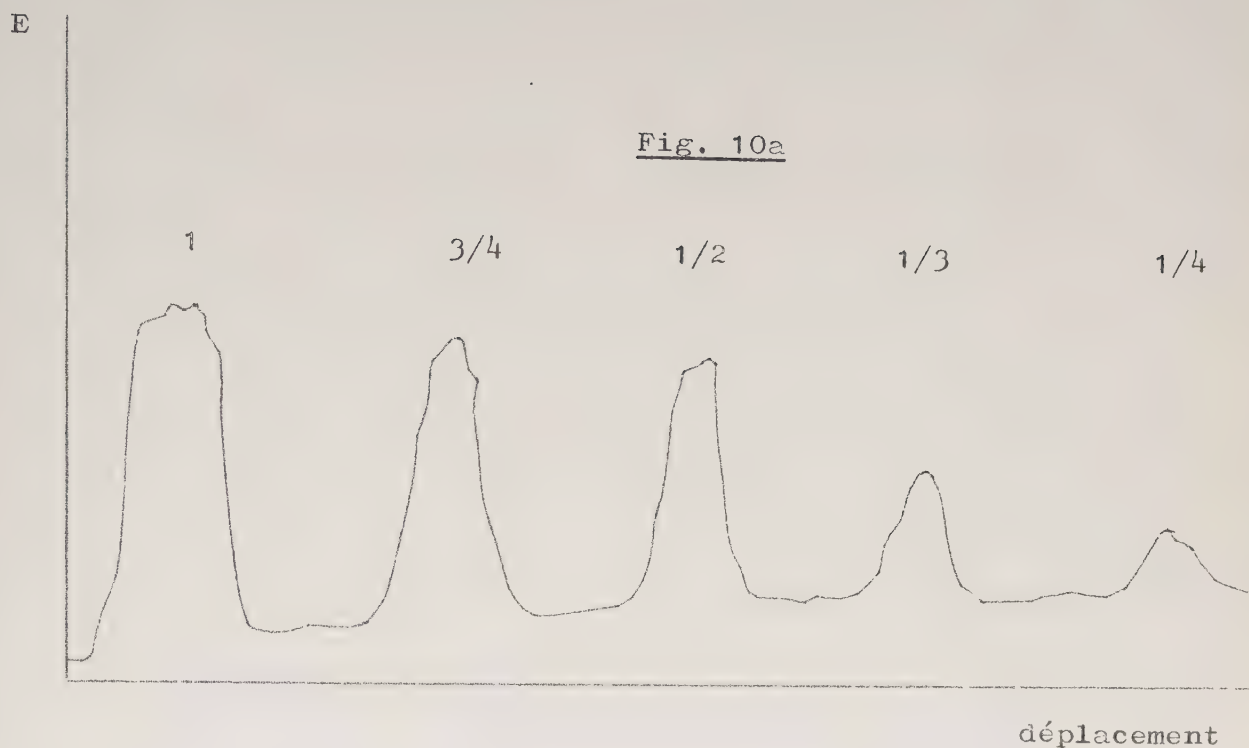
Comme nous l'avons déjà signalé, notre appareil de laboratoire n'est pas sensible aux taches rouge-orangé des acides bêta. C'est pourquoi, nous avons utilisé un autre appareil nous permettant d'établir une relation linéaire entre l'aire S des courbes d'extinction et la concentration C des spots correspondant soit $S = k_2 \times C$

L'enregistrement de la courbe d'extinction des acides alpha à 600 m μ est reproduit sur la figure 10a tandis que la relation $S = k_2 \times C$ est représentée par la courbe 10b. Les limites de concentration sont les mêmes que précédemment et l'aire S est déterminée par pesée.

Les figures 11a à 11b se réfèrent à l'enregistrement des acides bêta en lumière blanche.

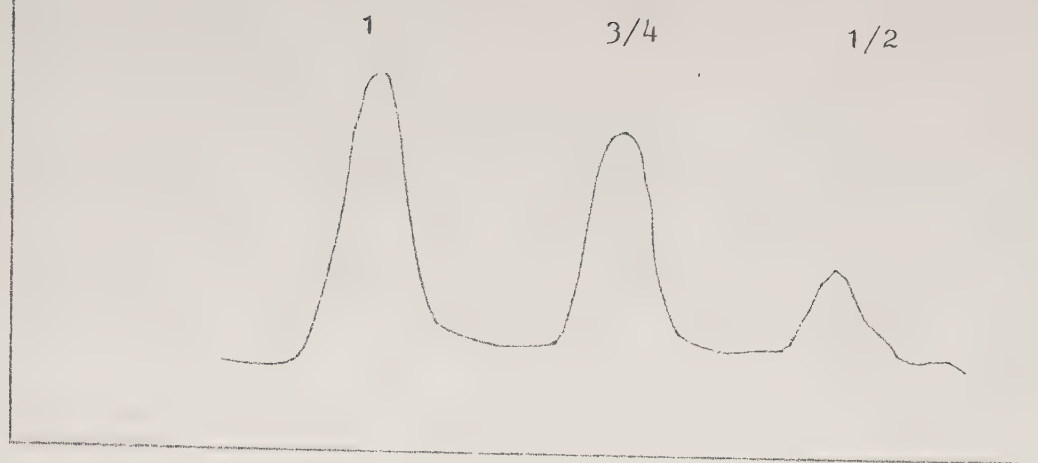
D) Pour la photodensitométrie, il est nécessaire de réaliser une échelle de concentration avec des témoins dont la teneur en acides alpha est connue.

L'expérience montre qu'il n'est pas indispensable pour le contrôle courant, d'utiliser des produits purs. Un "concentré" dont la teneur en acides alpha aura été préalablement déterminée, soit par spectrophotométrie après isolement, soit par photodensi-



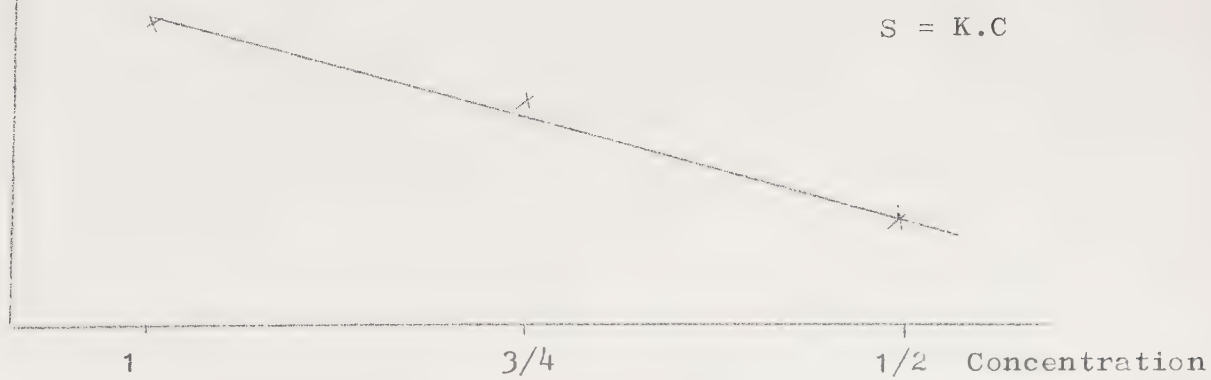
E

Fig. 11a



urface

Fig. 11b



tométrie à l'aide d'acides alpha et bêta purifiés, peut servir d'étalon ; les acides amers sont plus stables dans les extraits qu'à l'état isolé et pur.

IX - EVOLUTION DES ACIDES ALPHA.

A) Lorsqu'on ajoute du houblon en chaudière à houblonner, la transformation des acides alpha se produit en deux phases ; il y a tout d'abord dispersion dans le milieu réactionnel, ce qui dure environ 20 mn (28), puis la réaction de transformation se déroule, elle est du premier ordre, c'est à dire qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme des concentrations en acide alpha et les temps de prélèvement. Ces deux réactions successives dépendent de la densité du moût, de son pH, de sa teneur en oxygène (29).

Lorsqu'on utilise un concentré, le problème de la dispersion est plus délicat ; le produit est peu soluble en milieu aqueux et les fines gouttelettes initialement formées, se collent en partie sur les parois, sur l'agitateur et c'est autant d'acide alpha soustraits à la transformation en isocomposés. C'est pourquoi, au cours des différents essais, nous avons ajouté une quantité connue de concentré et nous avons dosé les acides alpha retrouvés dans le milieu, après les avoir isolés.

B) Un poids de concentré ($22,5 \pm 1.5$ % d'acides alpha), correspondant à environ 100 ppm d'acides alpha, est dissous dans 100 ml de méthanol, puis versé dans 2 l du milieu à l'ébullition. Un échantillon du mélange est prélevé périodiquement et extrait à l'isooctane ; le solvant est évaporé à basse température, le résidu repris avec du méthanol et une partie aliquote déposée sur la plaque chromatographique. Après séparation, les acides alpha élués sont dosés par la mesure de la densité optique 325 m μ .

C) Un certain nombre de résultats sont consignés dans le tableau N° 12 et les courbes correspondantes tracées sur la figure 12.

Tableau N° 12

Expériences temps d'ébullition en minutes	a	b	c	d	e
	moût 13,5 b° pH 5,5 - 5,6	eau distillée	eau distillée cholate de Na 0,2% P/V	tampon phosphate/citrate pH 6 + cholate de Na 0,2 %	tampon phosphate/citrate pH 5,6 + cholate de Na 0,2 %
0	100	102	110	93	97.5
15	26.5	59	94	76	52.0
30	13.0	52.5	77.5	72	39.5
60	8.5	48	68	65	30.5
120	3.0	46.0	61	53	10.0

Au cours des expériences (c) (d) (e) nous avons utilisé un émulsifiant des graisses ; le cholate de sodium, pour empêcher l'agglutination des particules de concentré. Le résultat est excellent, il n'y a plus d'agglomération des gouttelettes et il semble que cela favorise la régularité de la réaction au cours des premiers instants (0 à 20 mn).

Pour les opérations (a) et (e) figure 13, nous avons tracé la courbe du logarithme des concentrations en fonction du temps ; entre 20 et 120 mn. La relation est linéaire ce qui indique que la réaction de transformation des acides alpha est bien du premier ordre ; nous pourrions en déduire par extrapolation, la valeur théorique de la concentration initiale, mais non la valeur réelle de sorte que le problème reste entier.

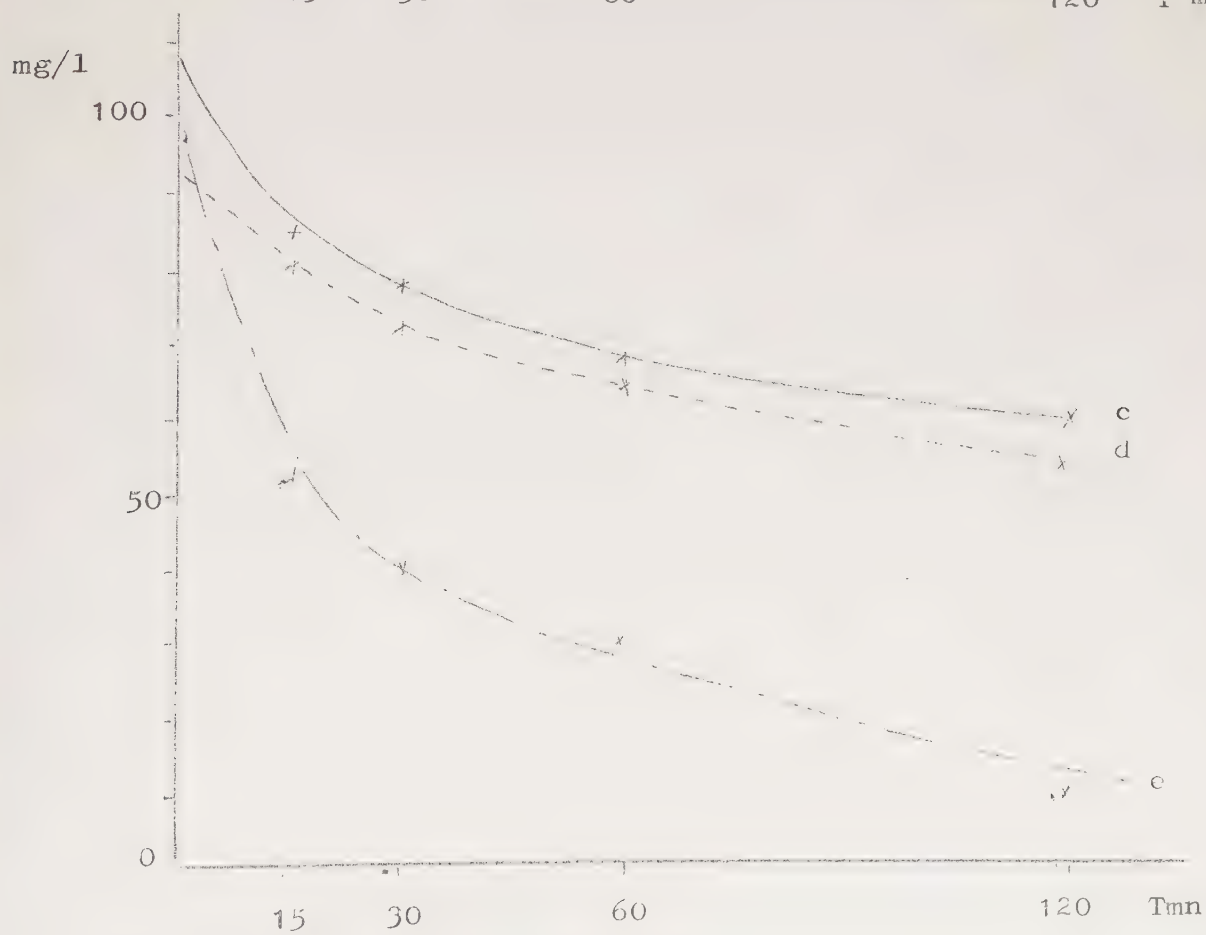
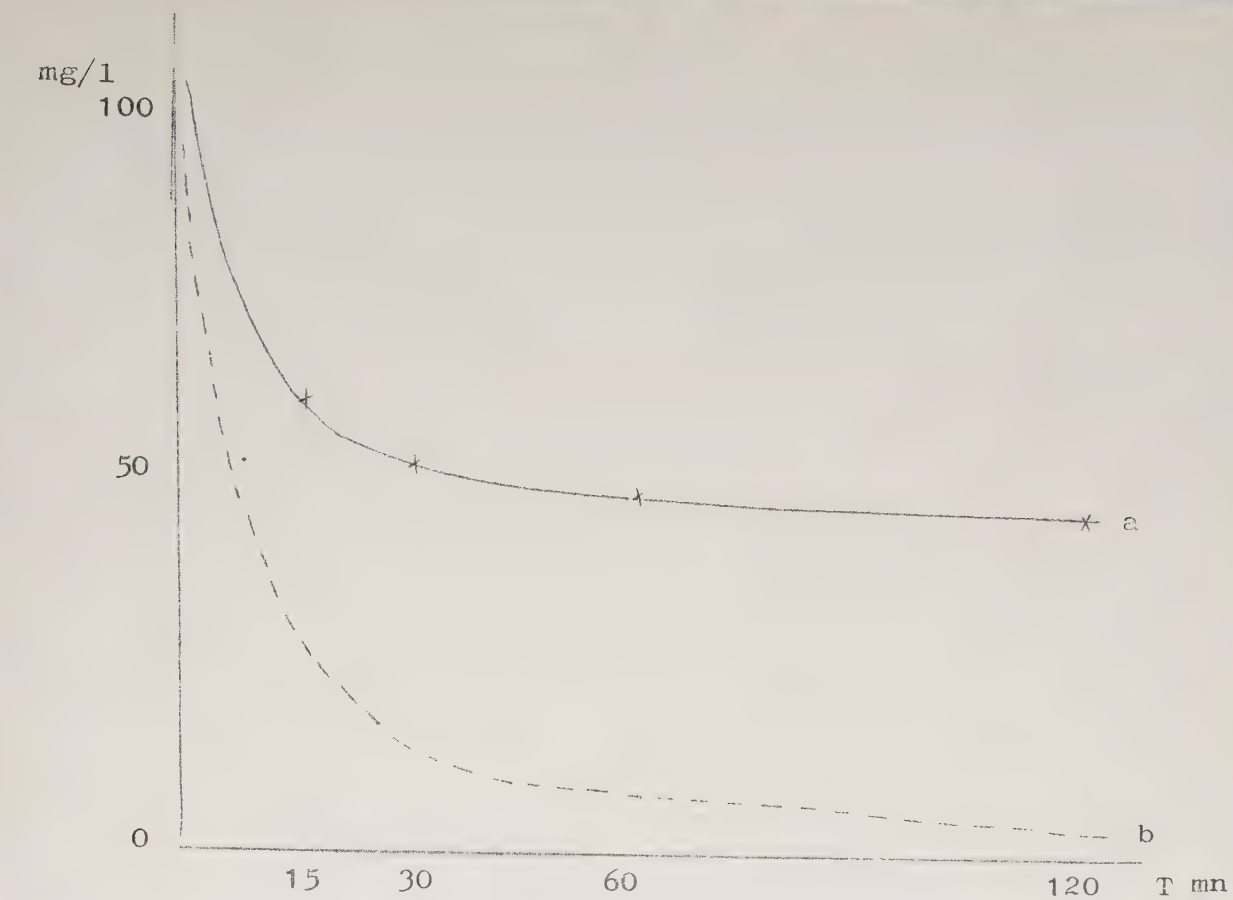


Fig. 12

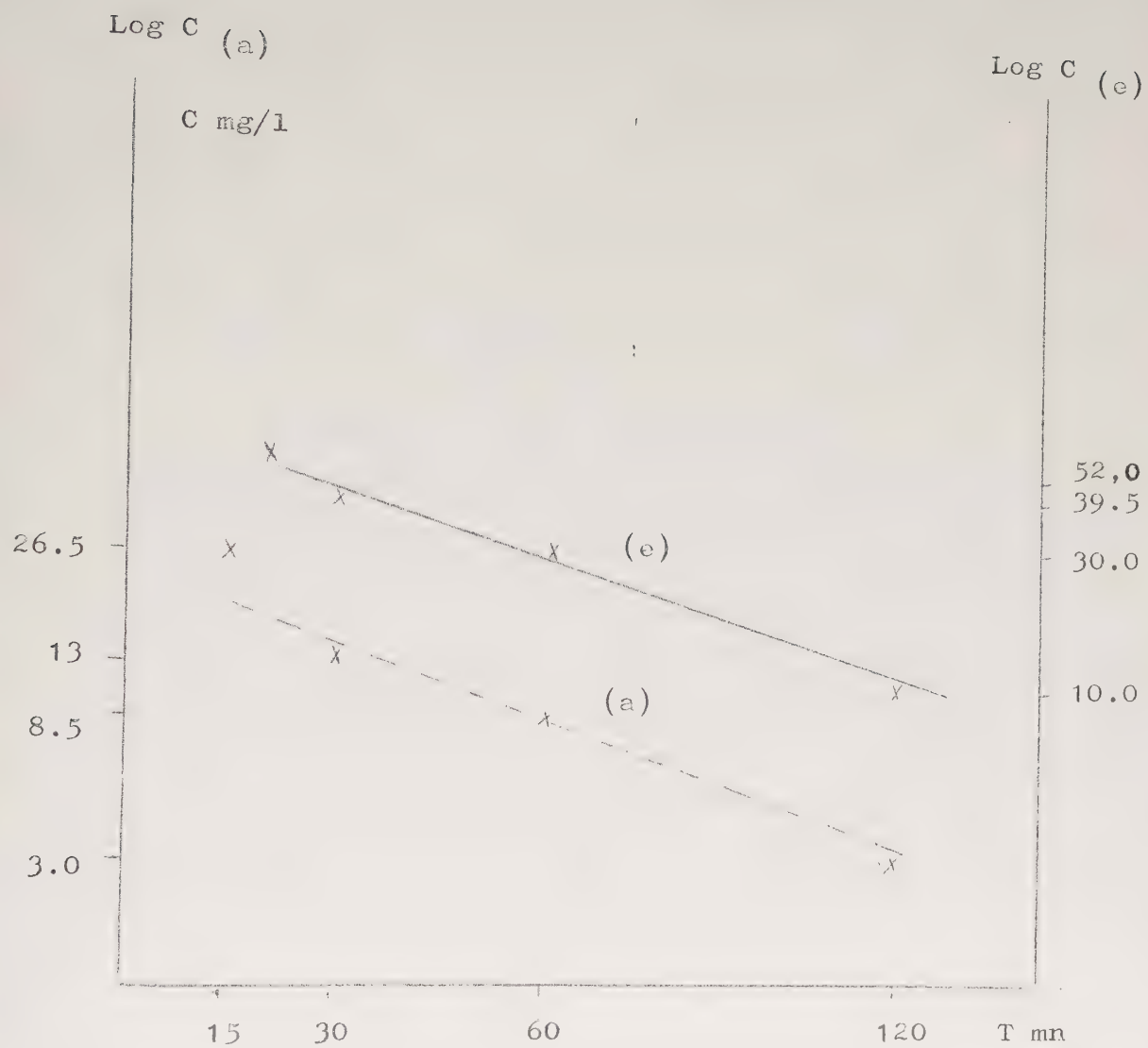


Fig.13

Nous n'avons pas pu poursuivre nos expériences, car le trop grand nombre de manipulations successives altérerait les acides alpha au moment des mesures spectrophotométriques et conduisait à des résultats aberrants.

X - CONCLUSION.

Le but de ce travail était de faire une mise au point sur les méthodes actuelles de dosage des acides alpha et des acides bêta dans les houblons et dans les concentrés.

Nous avons montré l'intérêt, même dans le houblon natif, d'un isolement préalable des substances à doser pour en permettre une détermination précise et la nécessité de cet isolement préalable chez les concentrés.

Par photodensitométrie, après séparation par chromatographie sur couche mince, le dosage des acides alpha et des acides bêta est possible. Cette méthode a l'avantage d'être simple, rapide et de doser les acides amers seulement à l'exclusion de certains produits dérivés qui souvent les accompagnent mais elle demande l'emploi d'un photodensitomètre de sensibilité suffisante.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - Dr HILDEBRAND et col.
Technical Quaterly 2 (1964)
- 2 - A.L. WHITEAR
C.R. Congrès E.B.C. 1964, Stochohlm
- 3 - W. WÖLLMER
Wochenschrift für Brauerei, 47 (1930) 521
- 4 - F. SCHUR
Schweizer Br. Rundschau N° 8 (1964) 147
- 5 - B. TROLLE et R. DJURTOFF
Brauwissenschaft 11 (1958) 283
- 6 - B.D. HARTONG, H.E. JANSEN et F. MENDLIK
Tijdschr Brouwerij en Mouterij (1956/1957) 33
- 7 - V. SALAC et J. DYR
Cambrinus, 4 (1943) 253
- 8 - W.H. GOUGH
Journal Institute of Brewing, 62 (1956) 9
- 9 - G. GOVAERT et M. VERZELE
C.R. Congrès Ind. Fermentation Gand, 1947, 279
- 10 - M. VERZELE
Wallerstein Lab. Com. 20 (1957) 8
- 11 - G.A. HOWARD et P.A. MARTIN
Journal Institute of Brewing (1964) 424
- 12 - C. ALBERTON et Col.
Analytical Chemistry 26 (1954) 983
- 13 - W.J. KLOPPER
Brauwissenschaft, 8 (1955) 101
- 14 - M. VERZELE, H. CLAUS et M. VAN HOEY
Wallerstein Laboratories Comm. 28 (1965) 99
- 15 - L.O. SPETSIG, M. STENINGER et S. BROHULT
C.R. Congrès E.B.C. Copenhagen (1957) 22
- 16 - A. HARTL et W. KLEBER
C.R. Congrès E.B.C. Vienne (1961) 139

- 17 - M. VERZELE
Wallerstein Lab. Comm. 22 (1959) 173
- 18 - H. RAUM
Brauwissenschaft 6 (1956) 150
- 19 - A.R. STOCKER
Schweizer Br. Rundschau 71 (1961) 243
- 20 - A.L. WHITEAR
Chem. and Indust. (1962) 1464
- 21 - MORIESON et Col.
Proceedings of the 8 th Convention of the Institute of
Brewing (Australian Section) 1964
- 22 - Y. KUROIWA et H. HASHIMOTO
Journal Institute of Brewing (1961) 347
- 23 - F.L. RIGBY et J.L. BETHUNE
Proceedings A.S.B.C. (1950)
- 24 - P.R. ASHURST et A.L. WHITEAR
Journal Institute of Brewing (1965) 46
- 25 - A.L. WHITEAR
C.R. Congrès E.B.C. (1964) Stockohlm
- 26 - M. METCHE, J.P. HALUCK, NGUYEN QUAT HAO et Edmond URION
Bull. Soc. Chim. de France (1963) 1080
- 27 - M. METCHE, F. JACQUIN, Q.H. NGUYEN et E. URION
Bull. Soc. Chim. de France (1962) 1763
- 28 - L.O. SPETZIG
Monat. für Brauerei - Juillet 1964
- 29 - STANLEY W. FREY
A.S.B.C. (1965)
-

Deuxième Thèse

La Lyophilisation

* * * *

Vu et Approuvé :

Nancy, le 10 NOV. 1966

Le Doyen de la Faculté des Sciences

M. AUBRY

Vu et Permis d'Imprimer :

Nancy, le 17 NOV. 1966

Le Recteur

Président du Conseil de l'Université

P. IMBS

